

---

Aus dem Institut für Immunologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen  
Immunantwort und das Potential von  
cholesterolkonjugierter RNA als Adjuvans**



Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt  
von

**Hannah-Lena Obermann**  
aus Fritzlar

Marburg, 2014

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 18.07.2014

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Stefan Bauer

1. Korreferent: Prof. Dr. Stephan Becker

*Für Dennis.*

---

# INHALTSVERZEICHNIS

---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	viii
KAPITEL 1 – EINLEITUNG	1
1.1 Das Immunsystem . . . . .	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem . . . . .	2
1.2 Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) . . . . .	4
1.2.1 Toll-like Rezeptoren . . . . .	5
1.2.1.1 Liganden und Expression der TLR . . . . .	7
1.2.1.2 Endosomale TLR . . . . .	9
1.2.1.3 Signalwege der TLR . . . . .	10
1.2.1.4 Regulation der TLR7 und TLR9 Signalkaskade in pDC . . . . .	12
1.2.2 Zytoplasmatische PRR . . . . .	14
1.3 RNA/DNA-Hybride . . . . .	16
1.3.1 Virale RNA/DNA-Hybride . . . . .	16
1.3.2 Mitochondriale RNA/DNA-Hybride . . . . .	20
1.3.3 RNA/DNA-Hybride und Autoimmunität . . . . .	21
1.4 TLR-basierte Adjuvantien . . . . .	21
1.5 Zielsetzung . . . . .	24
KAPITEL 2 – MATERIAL	26
2.1 Geräte . . . . .	26
2.2 Chemikalien . . . . .	28
2.3 Reagenzien . . . . .	30
2.4 Puffer . . . . .	31
2.5 Medien und Zellkultur . . . . .	32
2.6 Bakterien . . . . .	34
2.7 Medien Bakterienkultur . . . . .	34
2.8 Kits . . . . .	34

2.9	Antikörper . . . . .	35
2.10	Stimulanzen . . . . .	37
2.11	Primer . . . . .	38
2.12	Viren . . . . .	39
2.13	Mausstämme . . . . .	39
2.14	Zelllinien . . . . .	39
2.15	Verbrauchsmaterialien . . . . .	40
2.16	Software . . . . .	41
KAPITEL 3 – METHODEN		42
3.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	42
3.1.1	PCR . . . . .	42
3.1.2	Genomextraktion aus <i>E. coli</i> -Kulturen . . . . .	43
3.1.3	Genomextraktion aus gereinigten Mitochondrien . . . . .	44
3.1.4	Messung von Nukleinsäure-Konzentrationen . . . . .	45
3.1.5	Herstellung doppelsträngiger Nukleinsäuren . . . . .	45
3.1.6	Schmelzkurvenanalyse von doppelsträngigen Nukleinsäuren . . . . .	46
3.1.7	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) . . . . .	47
3.2	Biochemische Methoden . . . . .	48
3.2.1	Aufreinigung von TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteinen . . . . .	48
3.2.2	BCA-Assay . . . . .	49
3.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	49
3.2.4	Bindungsstudie . . . . .	50
3.2.5	Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay (ELISA) . . . . .	51
3.2.5.1	Zytokin-ELISA . . . . .	51
3.2.5.2	Nukleinsäure-ELISA . . . . .	54
3.2.5.3	TLR-hIgG-Fc-Fusionsprotein-ELISA . . . . .	56
3.3	Zellkultur . . . . .	57
3.3.1	Zellzählung . . . . .	57
3.3.2	Isolation von Peripheral Blood Mononuclear Cells . . . . .	58
3.3.3	Präparation von murinem Knochenmark . . . . .	59
3.3.4	Kultivierung und Differenzierung von Flt3L-Kulturen . . . . .	60
3.3.5	Stimulation von primären Zellen . . . . .	60
3.3.6	Retrovirale Infektion von primären Zellen . . . . .	61
3.3.7	Transfektion von primären Zellen mit cholesterolkonjugierten Nukleinsäuren . . . . .	62
3.3.8	Arbeiten mit Zelllinien . . . . .	62

3.4	Durchflusszytometrie . . . . .	63
3.4.1	Oberflächenfärbung für die Durchflusszytometrie . . . . .	63
3.5	Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	64
3.6	Mitochondrienaufreinigung aus HEK-Zellen . . . . .	65
KAPITEL 4 – ERGEBNISSE		67
4.1	Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunität .	67
4.1.1	Synthetische RNA/DNA-Hybride induzieren eine Immunantwort in humanen PBMC . . . . .	67
4.1.2	TLR9 detektiert synthetische RNA/DNA-Hybride . . . . .	74
4.1.3	RNA/DNA-Hybride des HCMV-Genoms sind für die Induktion einer Immunreaktion nicht ausschließlich verantwortlich .	80
4.1.4	RNA/DNA-Hybride des Mitochondrien-Genoms sind für die Induktion einer Immunantwort nicht essentiell . . . . .	80
4.1.5	Nukleinsäuren des RNase H-defiziente <i>E. coli</i> -Stamms MIC2067 zeigen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm kein verändertes Stimulationspotential in Flt3L-DC . . . . .	82
4.1.6	RNA/DNA-Hybride sind in retrovirusinfizierten Flt3L-DC nachweisbar . . . . .	86
4.1.7	Mo-MuLV inhibiert die CpG2216-induzierte Sezernierung von IFN $\alpha$ . . . . .	87
4.2	Das Potential cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans . . . . .	90
4.2.1	Cholesterolkonjugierte einzelsträngige RNA40 induziert keine antivirale Immunantwort . . . . .	90
4.2.2	Cholesterolkonjugierte doppelsträngige RNA40 induziert eine Immunantwort in Flt3L-DC und wird von TLR7 detektiert . .	92
KAPITEL 5 – DISKUSSION		97
5.1	Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunität .	97
5.1.1	Synthetische RNA/DNA-Hybride induzieren eine Immunantwort über TLR9 . . . . .	99
5.1.2	RNA/DNA-Hybride als Bestandteil verschiedener Genome sind nicht primär für die Einleitung einer Immunantwort verantwortlich . . . . .	102
5.1.3	RNA/DNA-Hybride sind in retrovirusinfizierten Flt3L-DC nachweisbar, die retrovirale Infektion leitet aber keine antivirale Immunantwort ein . . . . .	105

5.2	Das Potential cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans . . . . .	107
5.2.1	Cholesterolkonjugierte doppelsträngige RNA40 induziert eine Immunantwort in Flt3L-DC und wird über TLR7 detektiert .	109
5.3	Ausblick . . . . .	111
5.3.1	Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Im- munantwort . . . . .	112
5.3.2	Das Potential cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans . .	114
ZUSAMMENFASSUNG		116
SUMMARY		118
LITERATURVERZEICHNIS		120
AKADEMISCHE LEHRER		139
DANKSAGUNG		140

---

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

κB	kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
AIM2	absent in melanoma 2
ALR	AIM2-like receptor
APC	antigenpräsentierende Zelle
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCR	B-Zell Rezeptor
bp	Basenpaar
CARD	caspase activation and recruitment domain
CD	cluster of differentiation
cDC	konventionelle dendritische Zelle
Chol	Cholesterol
CLR	C-type lectin receptor
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DAMP	damage-associated molecular pattern
DAP12	DNAX activation protein 12
DC	dendritische Zelle
DD	death domain



DNA	deoxyribonucleic acid
ds	Doppelstrang
EBV	Epstein-Barr-Virus
eIF-2A	eukaryotischer Initiationsfaktor 2A
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescent activated cell sorting
FcεR1γ	FcεRezeptor1γ
Flt3L	FMS-like tyrosinkinase 3 ligand
FSC	forward scatter
gag	gruppenspezifisches Antigen
h	hour/Stunde
HCMV	humanes Zytomegalievirus
HIN	hematopoietic interferon-inducible nuclear protein
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HPV	humanes Papillomvirus
HRP	horseradish peroxidase
HSV	Herpes-simplex Virus
IκB	inhibitor of κB
IκK	inhibitor of κB kinase
IκKi	inducible IκB kinase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor

iMO	inflammatorische Monozyten
IP-10	interferon gamma-induced protein 10, auch CXCL10
IPS1	IFN $\beta$ promotor stimulator 1
IRAK	IL-1R associated protein kinase
IRF	interferon regulatory factor
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPDC	Lamina propria DC
LPS	Lipopolysaccharid
LR PCR	long range polymerase chain reaction
LRO	lysosome-related organelle
LRR	leucin rich repeat
M $\phi$	Makrophage
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MCMV	murines Zytomegalievirus
MDA-5	melanoma differentiation associated gene 5
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MMTV	Maus-Mammatumovirus
Mo-MuLV	Moloney MuLV
MOI	multiplicity of infection
MRP	mtRNA-processing endoribonuclease
mtDNA	mitochondriale DNA
mtGenom	mitochondriales Genom

MuLV	murines Leukämievirus
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NALP	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like receptor
NOD	nucleotide-binding oligomerisation domain
OAS	Oligoadenylat-Synthetase
oriLyt	origin of replication des lytischen Replikationszyklus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	polymerase chain reaction
PD	Phosphodiester
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PKR	protein kinase RNA-activated
Poly I:C	polyinosinic polycytidylic acid
PPT	Polypurintrakt
PRR	pattern recognition receptor
PTO	Phosphorothioat
PYD	pyrin domain
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RIP1	receptor-interacting protein-1
RLR	RIG-I-like receptors

RNA	ribonucleic acid
RNase H	Ribonuklease H
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Respiratorische-Synzytial-Virus
s	Sekunde
Siglec-H	sialic acid-binding Ig-like lectin molecule
siRNA	small interfering RNA
ss	single-stranded
SSC	sideward scatter
TAB	TAK1-binding protein
TAK	TGF- $\beta$ -activated kinase
TANK	TRAF family-member-associated NF $\kappa$ B activator
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF- $\beta$	tumor growth factor $\beta$
TIR	Toll/Interleukin-1 receptor domain
TIRAP	TIR-domain containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRAF	tumor necrosis factor receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TREX1	three prime repair exonuclease 1
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
tRNA	transfer RNA

UNC93B1	Unc-93 homolog B1
ÜS	Überstand
ü. N.	über Nacht

---

# KAPITEL 1

---

## Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bietet dem Körper die Möglichkeit zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu differenzieren. Es besteht aus einer Vielzahl von Effektorzellen und Molekülen, welche den Körper vor infektiösen Erregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, die zum Teil lebensbedrohliche Infektionen auslösen können, schützen.

Die initiale nicht erregerspezifische Komponente einer Immunantwort wird durch die sogenannte angeborene (innate) Immunreaktion vermittelt. Eine erregerspezifische, zeitlich verzögerte Abwehr wird durch die erworbene (adaptive) Immunabwehr geleistet. Das angeborene und das adaptive Immunsystem arbeiten eng zusammen.

Dringt ein pathogener Mikroorganismus in den Körper ein, wird eine angeborene Immunantwort eingeleitet. Gleichzeitig aktivieren die Zellen des angeborenen Immunsystems B- und T-Lymphozyten der erworbenen Immunantwort, wodurch die Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten und die Sekretion von Antikörpern eingeleitet wird [Guermontprez et al. 2002]. Auch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses wird zu diesem Zeitpunkt angeregt, wodurch bei einer erneuten Infektion mit einem bekannten Pathogen eine sofortige Eliminierung des Eindringlings erfolgen kann. B- und T-Lymphozyten exprimieren an ihrer Oberfläche spezifische Rezeptoren von hoher Diversität, die B-Zell-Rezeptoren (BCR) und T-Zell-Rezeptoren (TCR), welche eine Vielzahl verschiedener Antigene erkennen. BCR und TCR werden im Verlauf der B- und T-Lymphozytendifferenzierung durch DNA-Rekombination generiert [Jackson et al. 2013].

Alle Immunzellen stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen

ab, aus welchen die Vorläuferzellen der myeloiden und der lymphatischen Zelllinie hervorgehen. B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden der lymphatischen Linie zugeordnet. Alle übrigen Immunzellen wie Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, Erythrozyten und Megakaryozyten gehören zur myeloiden Linie [Murphy 2011].

Eine Fehlleitung von Immunreaktionen kann sich in der Ausbildung von Allergien oder Autoimmunerkrankungen äußern, weshalb eine strenge Regulation des äußerst komplexen Immunsystems notwendig ist.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Für eindringende Mikroorganismen stellt die angeborene Immunität das erste Hindernis dar. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem ist die angeborene Immunität weder erregerspezifisch noch führt sie zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Den wesentlichen Vorteil der angeborenen Immunabwehr stellt die direkte Verfügbarkeit dar. Außerdem ist die angeborene Immunität unerlässlich für die Einleitung einer effektiven adaptiven Immunantwort [Palm et al. 2009].

Die erste Hürde für eindringende Erreger stellen äußere Oberflächen wie Schleimhäute der Atemwege und des Verdauungssystems dar. Diese Epithelien formen physikalische (z. B. tight junctions der Epithelzellen), chemische (z. B. Defensine) und mikrobielle Barrieren (normale Flora), wodurch Erreger außerhalb des Körpers gehalten und eine Kolonisierung der Epithelien durch Pathogene verhindert wird. Wird diese initiale Barriere dennoch von einem Pathogen überwunden, stehen weitere zelluläre und humorale Mechanismen zur Kontrolle oder Eliminierung zur Verfügung.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems werden durch phagozytierende Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten vertreten, aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine entscheidende Rolle bei der Abtötung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen. Zur humoralen Komponente gehören antimikrobielle Peptide, akute Phase Proteine sowie das Komplementsystem, welches in der Lage ist, Pathogene zu lysieren und zu opsonisieren.

Die Einleitung einer angeborenen Immunantwort beruht im Wesentlichen auf der Erkennung körperfremder hoch konservierter pathogener Strukturen, den pathogen-associated molecular patterns (PAMP), durch keimbahnkodierte intrazellulär- oder oberflächenexprimierte pattern recognition receptors (PRR) [H. Kumar et al. 2011]. Zu den PAMP zählen u. a. mannosereiche Oligosaccharide, Peptidoglykane und Lipopolysaccharide der Bakterienzellwand, aber auch bakterielle und virale Nukleinsäuren und pathogenspezifische Replikationsintermediate.

Erfolgte die Phagozytose eines Erregers z. B. durch Gewebemakrophagen, wird über die PRR eine Signalkaskade aktiviert, die zur Sezernierung verschiedener Zytokine führt. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ), IL-6 (Interleukin-6) und TNF- $\alpha$  (tumor-necrosis factor- $\alpha$ ) wirken u. a. vasodilatorisch, wodurch beispielsweise Granulozyten und Monozyten aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe einwandern können.

Nach erfolgter Pathogendetektion durch Makrophagen wandern neutrophile Granulozyten am Entzündungsort ein. Sie sind ebenfalls phagozytosefähig und besitzen degradierende Enzyme wie Lysozym und Kollagenasen aber auch antimikrobielle Substanzen wie Defensine und Laktoferrin. Einwandernde Monozyten differenzieren je nach Zytokinmilieu zu Gewebemakrophagen oder dendritischen Zellen.

Dendritische Zellen wiederum können aus der myeloiden oder der lymphoiden Linie entstehen. Die sogenannten konventionellen dendritischen Zellen (cDC) sind hauptsächlich für die Prozessierung von Antigenen und deren Präsentation über MHC-II-Moleküle (major histocompatibility complex) verantwortlich. Die Sekretion von Zytokinen und die Expression kostimulatorischer Moleküle führt zur Aktivierung naiver T-Zellen und stellt eine Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität her. Konventionelle dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC).

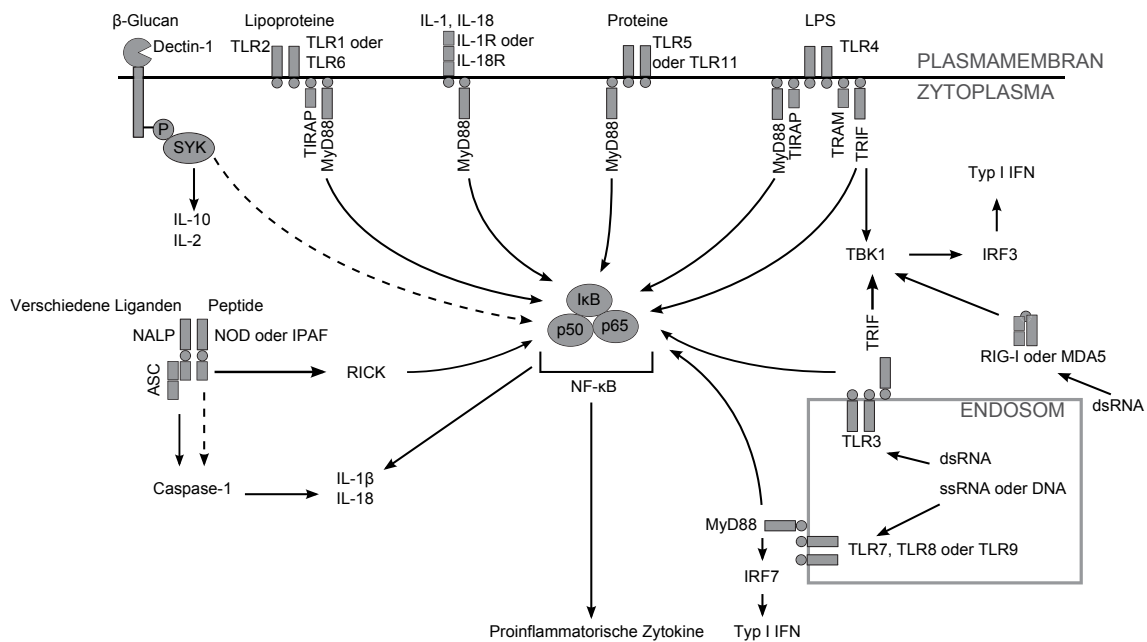
Ein besonderer Subtyp der dendritischen Zellen wird durch die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) vertreten. Als Hauptproduzenten von IFN $\alpha$  (Interferon  $\alpha$ ) besitzen sie eine äußerst effektive antivirale Wirkung und beginnen innerhalb kürzester Zeit nach Virusdetektion mit der Produktion und Sezernierung, wodurch ein antiviraler Status sowohl in der infizierten als auch in benachbarten Zellen hergestellt wird [Lande et al. 2010]. In diesen Zellen werden u. a. Proteine induziert, welche eine weitere Virusreplikation unterbinden (z. B. PKR (protein kinase RNA-activated)) und den Abbau viraler und zellulärer Ribonukleinsäuren (RNA) bewirken (z. B. RNase L) [Clemens et al. 1997; Farrell et al. 1977; M. Kumar et al. 1998]. Außerdem werden NK-Zellen aktiviert, welche in der Lage sind, virusinfizierte Zellen abzutöten.

Das angeborene Immunsystem kann eine Vielzahl von Pathogenen erkennen und eliminieren, wodurch die Etablierung verschiedener Infektionen effektiv verhindert werden kann.



## 1.2 Pattern Recognition Rezeptoren (PRR)

Wie unter 1.1.1 beschrieben, beruht die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd durch das angeborene Immunsystem auf keimbahnkodierten PRR. Während die Rezeptoren der adaptiven Immunität eine extreme Diversität aufweisen, findet sich auf allen Zellen desselben Zelltyps des angeborenen Immunsystems ein bestimmtes Repertoire keimbahnkodierter Rezeptoren. Abbildung 1.1 zeigt die Strukturen und Signalwege der PPR.



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Strukturen und Signalwege der PRR.** Dargestellt sind die Adaptermoleküle und die wichtigsten Signalkaskaden der verschiedenen PRR. In die TLR-Signalwege sind u. a. MyD88, NF- $\kappa$ B und IRF7 involviert. Dectin-1 ist exemplarisch für membranständige C-type lectin receptors dargestellt. RIG-I, MDA-5, NOD und NALP sind als Vertreter der zytosolischen PRR gezeigt [Trinchieri et al. 2007].

PRR kommen als membranständige, zytosolische oder als sezernierte extrazelluläre Moleküle vor. Nach Aktivierung der PRR über entsprechende Liganden wie PAMP (pathogen-associated molecular patterns) oder DAMP (damage-associated molecular patterns), welche von beschädigten Zellen freigesetzt werden und nicht im Zusammenhang mit einer infektiösen Entzündung stehen, kommt es u. a. zur Einleitung proinflammatorischer/antiviraler Signalkaskaden, zur Opsonisierung und Phagozytose der Pathogene oder zur Einleitung der Apoptose.

Membranständige PRR können zum einen die Phagozytose gebundener Patho-

gene einleiten (z. B. Mannose-Rezeptor, Scavenger Rezeptoren, DEC205) und zum anderen die Expression von Effektor- und Oberflächenmolekülen induzieren (z. B. Toll-like receptors (TLR), C-type lectin receptors (CLR)). Des Weiteren sind chemotaktische PRR (z. B. fMet-Leu-Phe-Rezeptor) bekannt, wodurch Immunzellen zum Infektionsort geleitet werden. Sezernierte PRR sind hauptsächlich an der Pathogenopsonisierung, der Aktivierung des Komplementsystems und am Transfer bestimmter PAMP zum entsprechenden PRR (z. B. LPS binding protein) beteiligt.

Zytosolische PRR gehören zu den signalgebenden Rezeptoren und können in vier Klassen unterteilt werden: Interferon induzierbare Proteine, retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors (RLR), nucleotide-binding oligomerisation domain (NOD)-like receptors (NLR) und absent-in-melanoma-like receptors (ALR). Während die durch Interferon induzierbaren Proteine wie die Proteinkinase R (PKR) und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) sowie den retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors (RLR) RIG-I und melanoma differentiation associated gene 5 (MDA-5) zentrale Bedeutung für die antivirale Immunantwort haben, sind NLR im Wesentlichen an der Abwehr bakterieller Infektionen beteiligt [Hansen et al. 2011; Janeway et al. 2002].

Die Signalgebung der Rezeptoren erfolgt über hoch konservierte Proteindomänen wie leucine-rich repeats (LRR), caspase activation and recruitment domains (CARD), pyrin domains (PYD), domains present in NAIP, CIITA, HET-E and TP1 (NACHT-Domänen), death domains (DD) und Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) Domänen [Takeuchi et al. 2010].

### 1.2.1 Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) sind sowohl für das angeborene Immunsystem als auch für die Induktion einer adäquaten adaptiven Immunantwort von zentraler Bedeutung. Ihre Benennung erfolgte nach dem Drosophila-Rezeptor „Toll“, welcher von Christiane Nüsslein-Volhard beschrieben wurde [Anderson et al. 1985]. Im Jahr 1994 konnte der erste menschliche TLR, heute als TLR1 bekannt, nachgewiesen werden und zwei Jahre später wurde gezeigt, dass ein enger Zusammenhang zwischen Toll-negativen Drosophila-Mutanten und der Anfälligkeit für Pilzinfektionen besteht [Lemaitre et al. 1996; Nomura et al. 1994]. Ein weiteres Jahr später wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass der Aktivierung des adaptiven Immunsystems über kostimulatorische Moleküle die Toll-like Rezeptorsignalkaskade vorausgeht [Medzhitov et al. 1997]. Derzeit konnten im menschlichen und im murinen System 13 TLR-Familienmitglieder nachgewiesen werden (TLR1-TLR13). Im Menschen ist die Expression

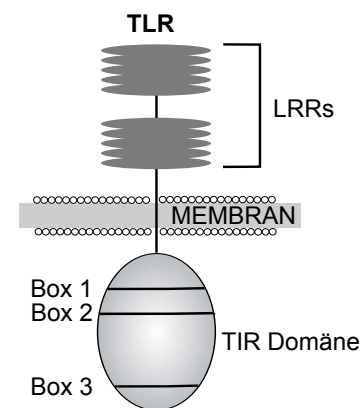
von zehn TLR-Familienmitgliedern bekannt, im murinen System werden 12 TLR-Mitglieder exprimiert. Eine retrovirale Insertion zerstörte beispielsweise im murinen System die Expression des TLR10 [Hasan et al. 2005]. TLR11, TLR12 und TLR13 hingegen werden im murinen System exprimiert [Yarovinsky 2014].

TLR gehören zu den Typ I Transmembran-Glykoproteinen und bestehen aus drei Domänen (Abbildung 1.2). Die aminoternale leucinreiche (leucin rich repeats (LRR)) extrazellulären Domäne ist für die Detektion der PAMP verantwortlich und die globuläre zytoplasmatische TIR-Domäne (Toll/Interleukin-1 receptor domain) leitet die Signalkaskaden durch Interaktionen mit verschiedenen Adapterproteinen ein. Beide Domänen werden durch eine transmembrane Region verbunden.

Nach erfolgter PAMP-Detektion durch TLR werden Signalkaskaden initiiert, welche die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, antiviralen Interferonen, interferoninduzierbaren Proteinen, Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen einleiten. Somit werden Pathogene eliminiert, weitere Immunzellen rekrutiert und die adaptive Immunantwort eingeleitet und reguliert.

Zu den von TLR detektierten PAMP gehören u. a. bakterielle und fungale Zellwandbestandteile, mikrobielle Proteine und Nukleinsäuren. Funktionelle TLR liegen entweder als Homo- oder Heterodimere vor, wodurch das Spektrum der erkannten PAMP deutlich erweitert wird. Während TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 in erster Linie auf der Zelloberfläche exprimiert werden und PAMP von Bakterien, Pilzen und Protozoen detektieren, werden TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR13 im endosomalen Kompartiment exprimiert und detektieren verschiedene Nukleinsäuren [Kawai et al. 2010; H. Kumar et al. 2011]. Dies ist vor allem bei viralen Infektionen sehr wichtig, da Viren oft zu einem großen Teil aus wirtseigenen Strukturen aufgebaut sind, die somit von den Immunzellen nicht als fremd erkannt werden können. Die intrazellulär vorkommenden TLR fördern eine antivirale Immunantwort und induzieren die Produktion von Typ I Interferonen [Kawai et al. 2009]. Die Lokalisation der TLR ist jedoch nicht statisch festgelegt, es handelt sich hierbei um eine dynamische Regulation [Kagan 2012].

Die TLR10-13 konnten bisher nicht vollständig charakterisiert werden. Für den humanen TLR10 wurde bislang kein PAMP identifiziert. TLR11 und TLR12 schei-



**Abbildung 1.2:** Darstellung der drei Domänen eines Toll-like Rezeptors [Akira et al. 2004].

nen eine Funktion bei der Immunabwehr von *Toxoplasma gondii* zu besitzen [Koblansky et al. 2013; Yarovinsky et al. 2005]. Für TLR11 konnte außerdem eine Rolle bei der Immunabwehr von uropathogenen Bakterien nachgewiesen werden [D. Zhang et al. 2004]. TLR13 ist an der Erkennung des vesikulären Stomatitisvirus beteiligt und detektiert bakterielle 23S rRNA [Oldenburg et al. 2012; Shi et al. 2011].

### 1.2.1.1 Liganden und Expression der TLR

TLR werden auf und in verschiedenen Immunzellen exprimiert. Dazu zählen B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten. Aber auch Nicht-Immunzellen wie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen exprimieren TLR [M. S. Lee et al. 2007]. Eine Übersicht der TLR, ihrer entsprechenden Liganden und ihre Expression ist Tabelle 1.1 zu entnehmen.

**Tabelle 1.1:** Liganden und zelluläre Expression der TLR [Abdelsadik et al. 2011; H. Kumar et al. 2011; M. S. Lee et al. 2007]

TLR	Ligand	Zelltyp
TLR1/2	Triacyl-Lipopeptide	M $\phi$ , cDC, Neutrophile, Mastzellen
TLR2	Lipoteichonsäure, Lipopeptide (Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> ), Peptidoglykan, mykobakterielles Lipoarabinomannan, Hämagglutinin, Phospholipomannan, Glykosylphosphatidyl-Inositol Mucin, Zymosan	M $\phi$ , cDC, Neutrophile, Mastzellen
TLR3	virale dsRNA, Poly(I:C), virale ssRNA, virale dsRNA, RSV, MCMV	cDC, murine M $\phi$ , Endothelzellen, Epithelzellen
TLR4	Lipopolysaccharid, Mannan, Glykoinositolphospholipide, Hüll- und Fusionsproteine des MMTV und RSV, Pneumolysin von <i>Streptococcus pneumoniae</i> , Placitaxel	M $\phi$ , cDC, Neutrophile, Mastzellen, Eosinophile, murine B-Lymphozyten

TLR	Ligand	Zelltyp
TLR5	bakterielles Flagellin	Monozyten, cDC, intestinale Epithelzellen
TLR6/2	Diacyl-Lipopeptide von Mykoplasmen (MALP2), Lipoteichonsäure, Zymosan	Monozyten, cDC, Neutrophile, Mastzellen
TLR7	virale ssRNA, Purin-Analoga (Imidazoquinoline), RNA von B Streptokokken, synthetische Poly(U)-RNA, siRNA	pDC, Neutrophile, Eosinophile, B-Lymphozyten
TLR8 (human)	ssRNA von RNA-Viren, Purin-Analoga (Imidazoquinoline)	Monozyten, cDC, Neutrophile, Mastzellen
TLR9	dsDNA Viren, HSV, MCMV, bakterielle und virale CpG-Motive, an Hemozoin gebundene Plasmodium-DNA	pDC, NK-Zellen, Eosinophile, Neutrophile, murine B-Lymphozyten
TLR10 (human)	wurde bisher nicht identifiziert	pDC, B-Lymphozyten
TLR11 (murin)	uropathogene Bakterien, profillinähnliches Molekül von <i>Toxoplasma gondii</i>	M $\phi$ , Epithelzellen
TLR12 (murin)	<i>Toxoplasma gondii</i>	bisher nicht vollständig analysiert
TLR13 (murin)	Bakterielle RNA, VSV	bisher nicht vollständig analysiert

Lipopeptide sind als Liganden für TLR2 eindeutig beschrieben. Im Falle von Peptidoglykan und weiteren Liganden wird davon ausgegangen, dass Lipopeptidverunreinigungen für den immunstimulatorischen Effekt verantwortlich sind. Ebenso ist Lipopolysaccharid wahrscheinlich der einzige Ligand für TLR4. Diese Vermutungen werden durch Ligand-Kristallstrukturen bekräftigt.

### 1.2.1.2 Endosomale TLR

Aufgrund der zellulären Lokalisation können die TLR in zwei Subtypen unterteilt werden: oberflächenexprimierte und endosomale TLR (siehe 1.2.1).

Für die Detektion von Nukleinsäurespezies sind vor allem die endosomal lokalisierten TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR13 verantwortlich.

TLR3 detektiert doppelsträngige RNA (dsRNA), die u. a. als genomische RNA in dsRNA-Viren (Reoviridae, Birnaviridae) vorkommt oder als Replikationsintermediat einzelsträngiger RNA- (ssRNA) Viren entsteht [Alexopoulou et al. 2001]. Des Weiteren erkennt TLR3 das synthetische dsRNA-Analogon Poly(I:C) (polyinosinic polycytidylic acid) [Alexopoulou et al. 2001]. Außerdem spielt TLR3 eine Rolle bei der Detektion von endogener mRNA [Karikó et al. 2004].

TLR7 wurde zunächst als Rezeptor für Imidazoquinolin-Derivate (Imiquimod, Resiquimod (R848)) und Guanin-Analoga (Loxoribin) beschrieben. Diese Derivate besitzen antivirale sowie antitumorale Eigenschaften [Hemmi et al. 2002]. Guanosin- und uridinreiche ssRNA wie die als RNA40 bekannte GU-reiche Sequenz der U5 Region von HIV-1, synthetische PolyU RNA und bestimmte siRNA konnten später als Liganden identifiziert werden [Bauer et al. 2008; Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004]. Für siRNA konnte die alternierende 2'-O-Ribose-Methylierung zur Inhibierung des immunstimulatorischen Potentials bei gleichzeitiger Erhaltung der Genmodulation charakterisiert werden [Hamm et al. 2010].

Phylogenetisch betrachtet, ist TLR8 dem TLR7 am ähnlichsten. Wie TLR7 detektiert der humane TLR8 ssRNA und R848 [Bauer et al. 2008].

Für TLR9 wurde synthetische nichtmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) DNA mit phosphothioatmodifiziertem Desoxyriboserückgrat als Ligand charakterisiert [Bauer et al. 2001; Dalpke et al. 2006; Hemmi et al. 2000]. Im Vertebraten häufig vorkommende DNA-Methylierungen machen eine Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd möglich. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unter erhöhter DNA-Aufnahme auch Wirts-DNA und nicht-CpG-Oligonukleotide als Ligand für TLR9 in Betracht kommen [Boulé et al. 2004; Yasuda et al. 2005]. Für DNA ohne Phosphothioat-Rückgrat konnte außerdem belegt werden, dass bei vorhandenem Phosphodiester-Rückgrat eine Aktivierung des TLR9 unabhängig von der Basensequenz erfolgen kann [Haas et al. 2008]. Außerdem wurde für an Hemozoin gebundene Plasmodium-DNA die Induktion einer Immunantwort über TLR9 belegt [Parroche et al. 2007]. Hemozoin entsteht als Nebenprodukt beim Abbau der Häm-Gruppe von Hämoglobin bei einer *Plasmodium falciparum*-Infektion. TLR9 befindet sich in ruhenden Zellen im endoplasmatischen Retikulum. Gelangt CpG-DNA in das

endo-/lysosomale Kompartiment, werden sowohl TLR9 als auch MyD88 als Adaptermolekül an die Orte der CpG-DNA-Akkumulation rekrutiert [Latz et al. 2004]. An diesem Rekrutierungsprozess ist außerdem UNC93B1 aktiv beteiligt [Kim et al. 2008; Tabeta et al. 2006]. Des Weiteren ist die schrittweise Prozessierung von TLR durch Cathepsine und die Asparaginendopeptidase (AEP) für die Einleitung der Signalkaskaden von Bedeutung [Ewald et al. 2011; Sepulveda et al. 2009].

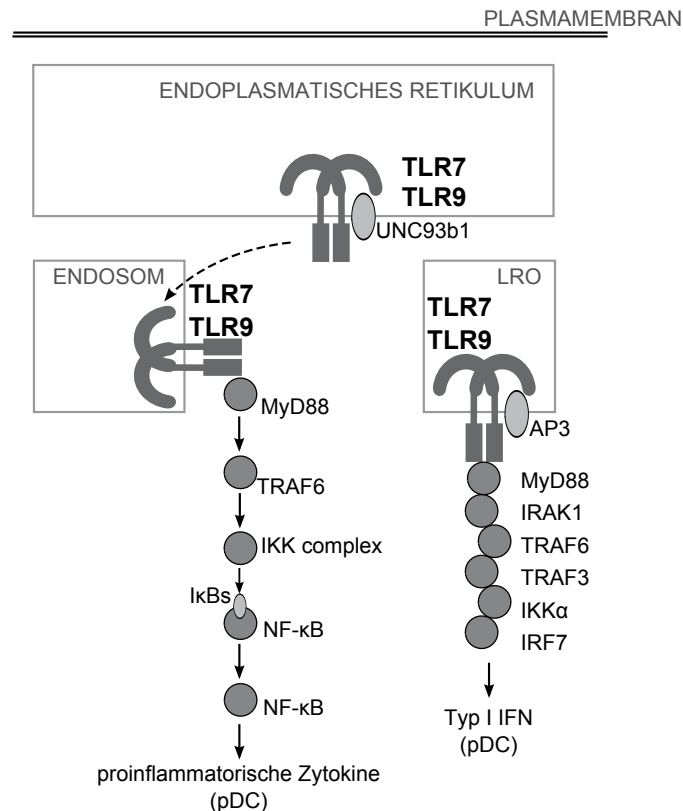
Aufgrund der endosomalen Lokalisation der nukleinsäuredetektierenden TLR, müssen ihre Liganden zunächst in die endo-/lysosomalen Kompartimente internalisiert werden, bevor sie von den entsprechenden TLR erkannt werden können. Virale DNA oder RNA liegt während des viralen Replikationszyklus normalerweise nicht in Lysosomen oder Endosomen vor. Diese Nukleinsäuren können zum einen im Falle eines fehlerhaften Replikationszyklus, wie z. B. bei unvollständiger Fusion der viralen Membran mit der endosomalen Membran, oder zum anderen durch Phagozytose von Viren oder abgestorbenen Zellen, erkannt werden. Auch Autophagieprozesse spielen eine Rolle bei der Detektion viraler und bakterieller Nukleinsäuren [H. K. Lee et al. 2007].

### 1.2.1.3 Signalwege der TLR

Zur Einleitung von Signaltransduktionskaskaden ist die zytoplasmatische TIR-Domäne der TLR essentiell. Nach Ligandenbindung, Dimerisierung und konformatiellen Veränderungen wird ein Signalweg ausgelöst, der zur Expression verschiedener Moleküle führt. Zwei TLR-Signalwege werden unterschieden. Zum einen der MyD88- (myeloid differentiation primary response protein 88) abhängige und zum anderen der MyD88-unabhängige Signalweg. Nach Einleitung der Signalkaskade über die TIR-Domäne werden Adapterproteine wie MyD88, TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ), TIRAP (TIR-domain containing adapter protein) und TRAM (TRIF-related adapter molecule), welche ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen, rekrutiert. Eine Übersicht der TLR7- und TLR9-Signalkaskaden in plasmazytoiden dendritischen Zellen ist Abbildung 1.3 zu entnehmen.

MyD88 stellt ein zentrales Adapterprotein dar, welches von fast allen TLR genutzt wird. Der MyD88-abhängige Signalweg aktiviert intrazelluläre Signalmoleküle wie IL-1R associated protein kinases (IRAKS), die TGF- $\beta$ -activated kinase (TAK1), die TAK1-binding proteins 1 (TAB1), 2 (TAB2) und den tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) [Kawai et al. 2011]. Nach Aktivierung des entsprechenden TLR wird MyD88 über seine TIR-Domäne zur TIR-Domäne des TLR rekrutiert. TLR2 und TLR4 benötigen zusätzlich das Adaptermolekül TIRAP,





**Abbildung 1.3: TLR7- und TLR9-Signalwege in plasmazytoiden dendritischen Zellen.** TLR7 und TLR9 werden mit Hilfe von UNC93B1 aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in das endosomale Kompartiment rekrutiert, wo die Detektion der Liganden erfolgt. Die Detektion von PAMP führt zur Dimerisierung der TLR und der anschließenden Rekrutierung des Adapterproteins MyD88. Die Aktivierung von NF-κB über TLR7 und TLR9 wird im Endosom initiiert und die IRF7-Aktivierung wird im LRO (lysosome-related organelle) eingeleitet, nachdem TLR7 und TLR9 aus dem Endosom in das LRO transportiert wurden [Kawai et al. 2011].

um MyD88 rekrutieren zu können [Horng et al. 2001]. MyD88 initiiert die Assoziation mit IRAK4 und IRAK1 über death-Domänen, welche sowohl MyD88 als auch die IRAK-Moleküle besitzen [Murphy 2011]. Während der Formation dieses Komplexes phosphoryliert die aktivierte IRAK4 die beiden Kinasen IRAK1 und IRAK2 und diese Phosphorylierung wiederum führt zur Interaktion von TRAF6 mit diesem Komplex. Der Komplex aus IRAK und TRAF6 interagiert mit einem weiteren Komplex, welcher aus TAK1, TAB1 und TAB2 besteht. Diese Interaktion löst die Phosphorylierung und Aktivierung von TAK1 aus und führt anschließend zur Aktivierung von IκB- (inhibitor of κB) Kinasen (IKKs). Das Inhibitormolekül IκB hält den Transkriptionsfaktor NF-κB (nuclear factor κB) im Zytoplasma zurück. Erfolgt die Phosphorylierung dieses Inhibitors durch IKK, wird er degradiert und NF-κB wird freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren. Die Aktivierung von TAK1,



selbst eine MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), resultiert in der Aktivierung von JNK (c-Jun N-terminal kinase) und weiteren MAP Kinasen. Der MyD88-abhängige Signalweg führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie  $\text{TNF}\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL-6, IL-12 und IL-1 $\beta$ , Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen.

Plasmazytoide dendritische Zellen sind in der Lage große Mengen an Typ I Interferonen zu produzieren. Dies erfolgt abhängig von MyD88. Nach erfolgter Stimulation der pDC durch entsprechende TLR-Liganden bildet sich ein Komplex, der aus MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF6 und IRF7 (interferon regulatory transcription factor) besteht. Dieser Komplex wird zu TLR7 oder TLR9 rekrutiert. IRAK1 phosphoryliert IRF7, welcher die Typ I IFN Produktion induziert [Akira 2009].

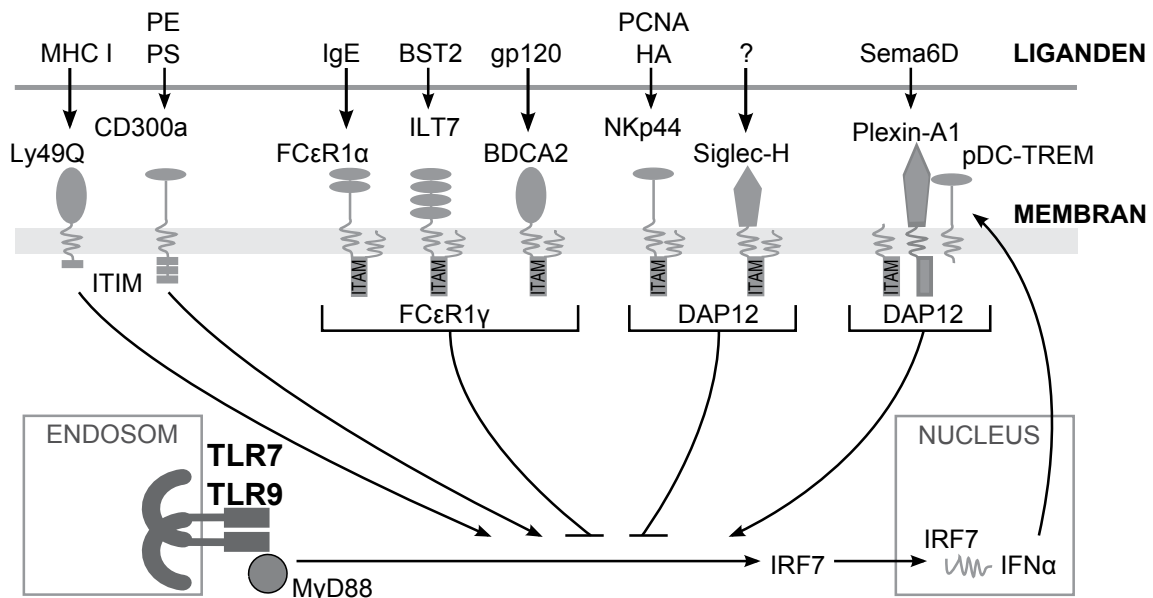
Die TLR3 und TLR4 sind neben der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auch in der Lage die Expression von Typ I Interferonen unabhängig von MyD88 zu induzieren. Ein weiteres Adaptermolekül wird anstelle von MyD88 rekrutiert, das als TIR domain-containing adapter protein inducing interferon- $\beta$  (TRIF) bezeichnet wird. Bezüglich des TLR4 ist ein zusätzliches Protein, das TRIF-related adapter molecule (TRAM) für die Komplexbildung notwendig. TRIF assoziiert mit TRAF6, TRAF3 und receptor-interacting protein-1 (RIP1). TRAF6 und RIP1 führen zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung über TAK, wohingegen TRAF3 zwei  $\text{I}\kappa\text{B}$  verwandte Kinasen aktiviert, die als TANK (TRAF family-member-associated NF- $\kappa$ B activator) binding kinase 1 (TBK1) und als inducible  $\text{I}\kappa\text{B}$  kinase ( $\text{I}\kappa\text{Ki}$ ) bezeichnet werden. Diese beiden Kinasen sind an der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 involviert, welche die Expression von IFN-induzierbaren Genen steuern [Kawai et al. 2011].

#### 1.2.1.4 Regulation der TLR7 und TLR9 Signalkaskade in pDC

Wie bereits unter 1.2.1.3 erwähnt, sind plasmazytoide dendritische Zellen fähig, große Mengen Typ I Interferone zu produzieren. Sie exprimieren selektiv die endosomalen TLR7 und TLR9, welche eine entscheidende Rolle in der Detektion von viralen, bakteriellen oder endogenen Nukleinsäuren spielen. Durch Ligandenbindung erfolgt die Einleitung der entsprechenden Signalkaskaden (1.2.1.3). Nach erfolgter IFN-Sekretion differenzieren pDC zu antigenpräsentierenden Zellen und nehmen somit Einfluss auf die T-Lymphozyten-vermittelte adaptive Immunantwort.

Synthetische CpG-TLR9-Liganden werden entsprechend ihrer Sequenz in verschiedene Typen unterteilt. Typ A CpG DNA besitzt ein zentrales palindromisches CpG-beinhaltendes Motiv, welches über Phosphodiesterbindungen verknüpft ist.

Am 3'-Ende liegt ein Poly-G-Strang vor, welcher über Phosphothioatbindungen verknüpft ist. Typ B CpG DNA hingegen besitzt ein vollständiges Phosphothioat-Rückgrat mit einem oder mehreren CpG-Dinukleotiden. Trifft TLR9 im frühen Endosom auf Typ A CpG DNA, so wird primär die IRF7-Signalkaskade eingeleitet, was zu einer Typ I IFN-Ausschüttung führt. IRF7 gilt in diesem Zusammenhang als Masterregulator und wird konstitutiv in pDC exprimiert, wodurch eine sofortige Ausschüttung von Typ I IFN erfolgen kann [Honda et al. 2005b]. Erfolgt jedoch die Bindung von Typ B CpG DNA an TLR9 im späten Endosom, wird in erster Linie der NF- $\kappa$ B/MAPK-Signalweg eingeleitet, der schließlich zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-6 führt [Guiducci et al. 2006; Honda et al. 2005a].



**Abbildung 1.4: Regulation der TLR7- und TLR9-Signalkaskaden durch Oberflächenrezeptoren der plasmazytoiden dendritischen Zellen.** Plasmazytoide DC exprimieren ITAM-assoziierte oder ITIM-besitzende Rezeptoren. Die Aktivierung der ITAM-assoziierten Rezeptoren FcεR1 $\alpha$ , ILT7, BDCA2, Nkp44 und Siglec-H inhibiert die TLR7/9-Signalkaskade. Eine Ausnahme ist pDC-TREM, welcher als ITAM-assoziiierter Rezeptor einen Aktivator des Signalweges darstellt. Die Aktivierung von ITIM-besitzenden Rezeptoren wie Ly49Q und CD300a aktivieren den TLR7/9-Signalweg [Bao et al. 2013].

Des Weiteren exprimieren pDC eine Reihe von Oberflächenrezeptoren und weiteren Adaptermolekülen, welche modulierend in die Signalkaskade eingreifen können (siehe Abbildung 1.4). Unter den Oberflächenmolekülen ist beispielsweise Siglec-H (sialic acid-binding Ig-like lectin molecule) im murinen System zu nennen und DAP12 (DNAX activation protein 12) sowie FcεR1 $\gamma$  als ITAM- (immunoreceptor

tyrosine-based activation motif) besitzende Adapterproteine. Einige Oberflächenrezeptoren assoziieren mit dem Molekül DAP12 und wirken sich inhibitorisch auf die Signalkaskade aus. Der murine Oberflächenrezeptor Siglec-H leitet Signalwege über den Adapter DAP12 ein. Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen Siglec-H die TLR9-vermittelte Typ I IFN-Produktion inhibieren. Außerdem exprimieren DAP12-defiziente Mäuse keine Siglec-H Oberflächenrezeptoren und sezernieren nach Stimulation mit CpG DNA deutlich mehr IFN im Vergleich zu Wildtyp pDC [Blasius et al. 2006; Pillai et al. 2012].

### 1.2.2 Zytosolische PRR

Sowohl virale als auch bakterielle Nukleinsäuren werden von PRR als PAMP detektiert, wodurch die Sekretion verschiedener Zytokine und die Aktivierung von weiteren Immunzellen erfolgt [Barbalat et al. 2011].

Das zytosolische Erkennungssystem für intrazelluläre PAMP wird in vier Klassen untergliedert: IFN-induzierbare Proteine, RLR (RIG-I-like receptors), NLR (NOD-like receptors) und ALR (AIM2-like receptors).

Zu den IFN-induzierbaren Proteinen gehören u. a. die Proteinkinase R und die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS). Die IFN induzierte PKR inaktiviert durch Phosphorylierung den für die Translation erforderlichen Initiationsfaktor eIF-2A (eukariotic translation initiation factor 2A). Die PKR ist ausschließlich in virus-infizierten Zellen aktiv, da sie auf die Aktivierung durch virale dsRNA angewiesen ist [Balachandran et al. 2007]. Die OAS hingegen katalysiert die Veresterung von bis zu fünf Adenosin-Triphosphaten (ATP) zu 2'-5'-gebundenen Oligoadenylaten. Diese wiederum binden an eine im Zytoplasma latent vorkommende Ribonuklease, die RNase L, welche virale und zelluläre RNA abbaut. Die katalytische Aktivität der OAS wird ebenfalls durch virale dsRNA aktiviert [Silverman et al. 2000].

Zu den zytosolischen RNA erkennenden Rezeptoren gehören RIG-I und MDA-5 [Kato et al. 2008; Kato et al. 2006; Schlee et al. 2009], welche 5'-Triphosphat RNA und hochmolekulare virale RNA als Liganden erkennen [Hornung et al. 2006; Pichlmair et al. 2006; Pichlmair et al. 2009]. Im Anschluss an die Rezeptoraktivierung erfolgt die Einleitung von Signalkaskaden, welche die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, MAPK und IRF bewirken. Sowohl Typ I Interferone als auch proinflammatorische Zytokine werden sezerniert. IPS1 (IFN $\beta$  promotor stimulator 1) dient als Adaptermolekül für RIG-I und MDA-5. Des Weiteren konnte für RIG-I eine Funktion bei der Erkennung von dsDNA nachgewiesen werden. AT-reiche dsDNA wird durch die wirtseigene RNA-Polymerase III in 5'-Triphosphat dsRNA umgeschrieben und somit

eine Erkennung durch RIG-I ermöglicht [Ablasser et al. 2009].

Die NLR bilden eine große Familie mit 23 Mitgliedern im humanen System und 34 Mitgliedern in der Maus. NOD1 und NOD2 beispielsweise, erkennen verschiedene strukturelle Motive, die von Peptidoglykanen grampositiver sowie gramnegativer Bakterien abgeleitet sind [Kawai et al. 2009]. Sie führen im Säugetier zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung und teilweise zur IFN $\beta$ -Produktion [Leber et al. 2008].

Weitere NLR, wie die NALP-Unterfamilie, bilden einen intrazellulären Komplex, der als Inflammasom bezeichnet wird. Dieser Komplex führt zu einer Caspase-1 vermittelten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine der IL-1 Familie (IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33). Caspase-1 spaltet die Proformen der Zytokine proteolytisch, worauf die Sezernierung der reifen Zytokine erfolgt [Kawai et al. 2009].

Innerhalb der NLR-Familie wird auch die antivirale Immunabwehr reguliert. NLRC5 (NLR family, CARD domain containing 5) spielt hier eine Rolle, da dieser Rezeptor die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, antiviraler Typ I Interferone und auch die Expression von MHC-I-Moleküle beeinflusst [Kawai et al. 2009; Kuenzel et al. 2010; Neerincx et al. 2010].

Lange Zeit war TLR9 der einzig bekannte Rezeptor für die Detektion von DNA. Heute sind weitere DNA-Sensoren, welche sowohl die Sezernierung von Typ I Interferonen als auch proinflammatorischer Zytokine einleiten, bekannt.

Zu der jungen Rezeptorfamilie der ALR (AIM2-like receptors), welche nach ihrem zuerst identifiziertem Mitglied AIM2 (absent in melanoma 2) benannt wurde, gehören im Menschen vier und in der Maus sechs Mitglieder [Unterholzner et al. 2010]. Alle ALR besitzen eine charakteristische IFI200- bzw. HIN200-Domäne. Drei der humanen ALR, MNDA (myeloid cell nuclear differentiation antigen), PYHIN1 (pyrin and HIN domain family member 1) und AIM2 enthalten eine N-terminale PYD gekoppelt an eine IFI200-Domäne, während das vierte Mitglied IFI16 (gamma-interferon-inducible protein 16) an dieser Stelle zwei Tandem IFI200-Domänen aufweist [Hansen et al. 2011]. Eine Funktion als PRR wurde bisher nur für AIM2 und IFI16 nachgewiesen. Die PYD von AIM2 kann über ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) die Aktivierung des Inflammasoms bewirken [Hornung et al. 2009]. Außerdem kann AIM2 auch über die IFI200-Domäne mit bakterieller und viraler dsDNA interagieren und die Typ I IFN-Produktion induzieren [Fernandes-Alnemri et al. 2009; Hansen et al. 2011; Roberts et al. 2009].

DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) wurde als IFN-induzierbarer zytoplasmatischer Rezeptor, der zwei Bindungsdomänen für linksgängige Z-DNA enthält beschrieben, welcher dsDNA verschiedenster Ursprünge detektiert.

Nach Ligandenbindung interagiert DAI mit TBK1 sowie IRF3 und führt zur Induktion von Typ I Interferonen [Takaoka et al. 2007]. DAI-defiziente Mäuse zeigten jedoch bezüglich der Erkennung von DNA keinen Phänotyp, weshalb die Relevanz von DAI als DNA-Rezeptor fraglich ist [Ishii et al. 2008].

Eine neuere Studie beschreibt, dass die Induktion der IFN $\alpha$ -Sekretion durch zytoplasmatische DNA-Detektion durch das Enzym cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) induziert wird. Nach erfolgter Ligandenbindung synthetisiert das Enzym cGAS den sekundären Botenstoff cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate), welcher wiederum zur Aktivierung von STING (stimulator of interferon genes) führt [Ablasser et al. 2013; P. Gao et al. 2013; Ishikawa et al. 2009; Sun et al. 2013; Wu et al. 2013].

## 1.3 RNA/DNA-Hybride

RNA/DNA-Hybride können sowohl im Verlauf von zelleigenen Prozesse als auch während bestimmter Infektionen und Erkrankungen transient auftreten. Zelleigene Vorgänge, welche zur Ausbildung von RNA/DNA-Hybriden führen, sind: Die Replikation des Kerngenoms (RNA-Primer, welche von der DNA-Polymerase als Startpunkt benötigt werden, werden komplementär zur genomischen DNA synthetisiert), die Gentranskription (eine zur DNA komplementäre mRNA wird synthetisiert), die Replikation der Telomere (die Telomerase besitzt ein internes zur telomeren DNA komplementäres RNA-Template), die Replikation des mitochondrialen Genoms (der R-Loop beinhaltet am Replikationsursprung des Leitstranges ein stabiles RNA/DNA-Hybrid, welches aus zwei DNA-Strängen und einem RNA-Strang besteht), sowie die Rekombination von Immunglobulin-Klassenswitch-Regionen [Clayton 2000; Mizuta et al. 2003; Shaw et al. 2008; B. Xu et al. 1996].

### 1.3.1 Virale RNA/DNA-Hybride

RNA/DNA-Hybride treten als Teil der genomischen Struktur einiger Viren und während des viralen Infektionszyklus als Replikationsintermediate auf. Einige DNA-Viren wie das humane Zytomegalievirus oder das Epstein-Barr-Virus, welche zur Familie der Herpesviridae gehören, benötigen zur Genomreplikation einen RNA-Primer, welcher komplementär an das DNA-Genom bindet [Prichard et al. 1998; Rennekamp et al. 2011]. Im Verlauf einer retroviralen Infektion wird die virale einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Für diese reverse Transkription besitzen humane und murine Retroviren sowie Hepadnaviren ein spezielles

Enzym, die Reverse Transkriptase [Baltimore 1970; Miller et al. 1984; Modrow 2010; Sarafianos et al. 2009]. Die entstehenden RNA/DNA-Hybride sind relativ kurzlebig, da der RNA-Anteil des Hybrids durch die RNase H-Funktion der Reversen Transkriptase abgebaut wird.

Die Familie der Retroviridae (Reverse Transkriptase Onkoviren) umfasst behüllte Viren mit einem einzelsträngigem RNA-Genom, welches in Plusstrang-Orientierung vorliegt. Das bekannteste humanpathogene Retrovirus ist das humane Immundefizienzvirus (HIV), welches zur Gattung der Lentiviren gehört. Das murine Leukämievirus (MuLV), welches zur Gattung der Gammaretroviren zählt, gehört neben dem humanen Immundefizienzvirus zu den am besten erforschten Virussystemen. Im Jahr 1981 wurde die vollständige genomische Sequenz eines Retrovirus publiziert. Es handelte sich um das Moloney-MuLV [Shinnick et al. 1981]. Aufgrund seiner intensiven Erforschung wird es häufig zur Konstruktion retroviraler Vektoren verwendet. Es ist bereits in vielen gentherapeutischen Studien im Einsatz. Ebenso werden auf seiner Basis replikationskompetente Vektoren entwickelt, die zur Bekämpfung von Tumoren verwendet werden könnten [Tai et al. 2008].

Die Reverse Transkriptase, welche die genomische RNA der Retroviren in doppelsträngige DNA umschreibt, wurde erstmals 1970 nachgewiesen [Baltimore 1970]. Die entstandene doppelsträngige DNA wird von der viralen Integrase in das Wirtszellgenom integriert. Folglich wird die eingebaute dsDNA mit dem wirtseigenen Genom repliziert. Während der reversen Transkription entsteht ein RNA/DNA-Hybrid als Replikationsintermediat [Varmus 1988].

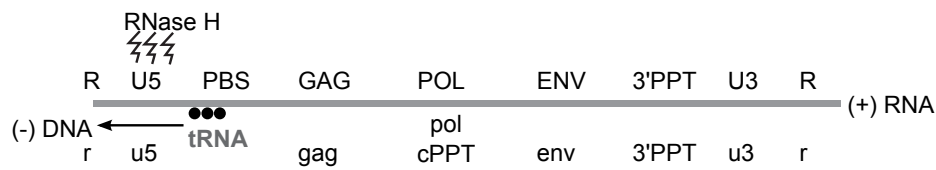
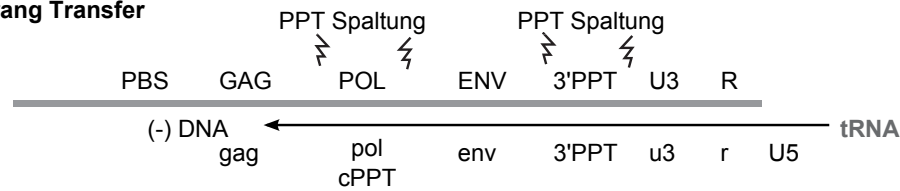
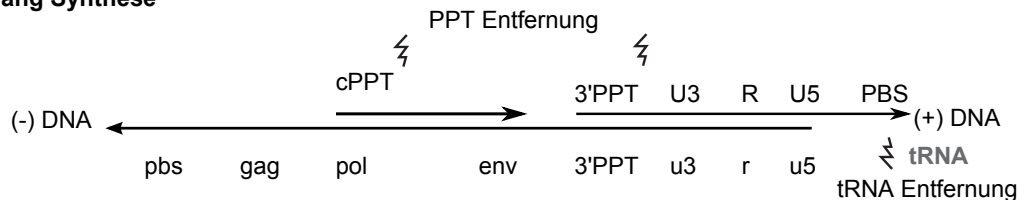
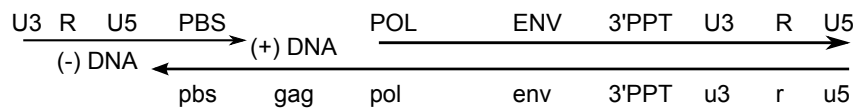
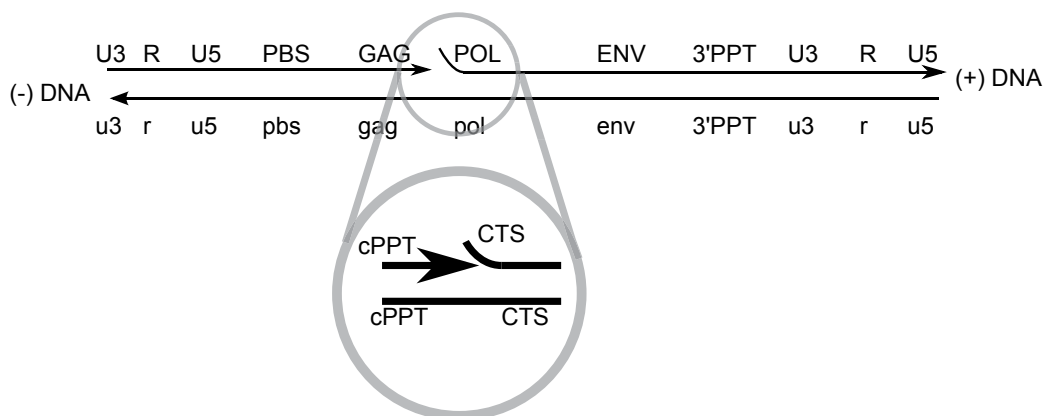
Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche einzelsträngige RNA in DNA umschreibt. Sie besitzt aber auch die Funktion einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase während sie den komplementären Zweitstrang für die dsDNA-Synthese bildet. Außerdem hat die Reverse Transkriptase die Funktion einer Helikase und der RNase H [Modrow 2010]. In Abbildung 1.5 ist die reverse Transkription des RNA-Genoms eines Retrovirus in dsDNA dargestellt. Besonderes Augenmerk gilt den entstehenden RNA/DNA-Hybriden. Da durch die RNase H-Funktion der Reversen Transkriptase der RNA-Anteil des entstehenden RNA/DNA-Hybrids relativ schnell abgebaut wird, sind die während der Reversen Transkription entstehenden RNA/DNA-Hybride nicht besonders langlebig. Es sind jedoch besondere RNA-Bereiche beschrieben, die gegenüber der Degradation durch die RNase H wesentlich stabiler sind. Diese RNA-Bereiche sind der sogenannte 3'-Polypurintrakt (3'-PPT) und der zentrale Polypurintrakt (cPPT). Die PPT beinhalten mindestens neun Adenosin- und Guanosinreste. Während die initiale Polymerisierung des



(-)DNA-Stranges eine wirtseigene tRNA als Primer verwendet, beginnt die nachfolgende (+)DNA-Strang-Synthese mit viralen Primern, den PPT. Diese identischen Stücke viraler genomischer RNA sind von der Template-Degradierung durch die RNase H nach der (-)DNA-Strang-Synthese nicht betroffen. Sie werden wahrscheinlich erst nach erfolgreicher Initiierung der (+)DNA-Strangsynthese entfernt [Rausch et al. 2004]. Hier bleiben RNA/DNA-Hybrid-Strukturen über einen längeren Zeitraum erhalten.

Man unterscheidet exogene und endogene Retroviren. Exogene Retroviren besitzen in ihrem Genom alle Informationen, die für den Ablauf eines Infektionszyklus mit Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln benötigt werden. Zudem kann das Genom bestimmter exogener Retroviren Onkogene enthalten. Endogene Retroviren sind in allen Zellen eines Organismus in das Genom integriert und werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen. Derartige Retrotransposons sind weit verbreitet und machen bis zu 1 % des menschlichen Genoms aus. Unter bestimmten Umständen ist es möglich, dass sie zur Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln aktiviert werden [Modrow 2010]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass endogene Retroviren in einigen Mausstämmen aktiv an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt sind. Die endosomalen TLR3, TLR7 und TLR9 besitzen eine zentrale Rolle in der Kontrolle endogener Retroviren [Yu et al. 2012].

Das humane Zytomegalievirus, auch humanes Herpesvirus 5 genannt, gehört in der Familie der Herpesviridae zur Unterfamilie der  $\beta$ -Herpesviren. Es handelt sich um behüllte Viren mit einem dsDNA-Genom [Modrow 2010]. Während des lytischen Replikationszyklus erfolgt die Initiation der Replikation des Genomes an einem cis-aktiven „origin of replication“ (oriLyt). Dieser oriLyt beinhaltet repetitive Elemente sowie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Innerhalb des oriLyt wurden Bereiche entdeckt, die RNA/DNA-Hybrid-Strukturen beinhalten und eine Länge von 300 und 500 Basenpaaren (bp) besitzen. Die 300 bp lange Region ist für den lytischen Replikationszyklus essentiell [Anders et al. 1992; Prichard et al. 1998]. Die beschriebenen RNA/DNA-Hybrid-Strukturen sind sehr stabil, schwierig abzubauen und in den Virionen enthalten. Virione, welche diese Hybrid-Strukturen nicht besitzen, sind defekt und replizieren ineffizient, was darauf hindeutet, dass die RNA/DNA-Hybride für die Replikation von zentraler Bedeutung sind. Wahrscheinlich fungieren die RNA-Bestandteile als Primer für die Replikation des DNA-Genoms [Prichard et al. 1998]. Für die Initiation der oriLyt-abhängigen Replikation ist das Phosphoprotein UL84 von zentraler Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass UL84 mit einer konservierten RNA-Haarnadelstruktur in der RNA/DNA-Hybridregion inner-

**a) Minus-Strang Synthese****b) Minus-Strang Transfer****c) Plus-Strang Synthese****d) Plus-Strang Transfer****e) Bidirektionale DNA Synthese**

**Abbildung 1.5: Reverse Transkription des retroviralen Genoms.** Die Initiierung der (+)DNA-Strangsynthese beginnt am 3'-PPT und am cPPT. Die PPT beinhalten mindestens neun Adenosin- und Guanosinreste und sind sehr stabil gegenüber der RNase H-vermittelten Degradierung [Rausch et al. 2004].

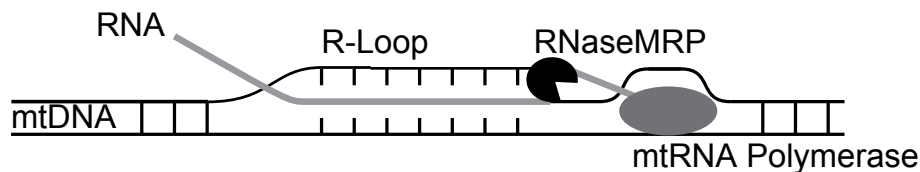


halb des oriLyt interagiert und somit die Replikation einleitet [Colletti et al. 2007].

### 1.3.2 Mitochondriale RNA/DNA-Hybride

Die Mitochondrien sind eukaryotische Zellorganellen, welche von zentraler Bedeutung für die zelluläre Energiebereitstellung sind. Energiereiches Adenosintriphosphat (ATP) wird während des Zitratzyklus und der Atmungskette gebildet. Eine Doppelmembran umgibt die Mitochondrien, die ein Netzwerk ausbilden, welches die gesamte Zelle durchzieht. Einzelne Mitochondrien können mit diesem Netzwerk fusionieren oder sich davon abspalten.

Eine Besonderheit der Mitochondrien besteht in der Existenz einer eigenen Erbsubstanz, welche in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist und dort in zehn bis 15 Kopien vorliegt. Pro Zelle können zwischen 100–10 000 Kopien der mtDNA vorhanden sein. Es handelt sich um ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom, welches zur eigenständigen Replikation fähig ist. Die menschliche mtDNA besteht aus 16 569 Basenpaaren.



**Abbildung 1.6: R-Loop des mitochondrialen Genoms.** Die RNA/DNA-Hybrid-Struktur im mitochondrialen Genom besteht aus der elterlichen dsDNA und einem RNA-Transkript [Ganten et al. 2003].

Im mitochondrialen Genom konnte in der Nähe des D-loops (displacement loop) ein untypisches stabiles RNA/DNA-Hybrid, auch R-Loop genannt, am Ursprung der Leitstrang-DNA-Replikation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 1.6). Der RNA/DNA-Hybrid-Bereich besteht aus der elterlichen DNA sowie einem RNA-Transkript. Alle drei Stränge interagieren miteinander und sind für die Initiation der Replikation der mtDNA nötig [Clayton 2000]. Um als Primer fungieren zu können, muss die RNA ein freies 3'-OH-Ende aufweisen, um von der DNA-Polymerase verwendet zu werden. Die RNase MRP (mtRNA-processing endoribonuclease), welche ausschließlich das triple-Strang-RNA/DNA-Hybrid als Substrat akzeptiert, prozessiert die RNA, die folglich als Primer erkannt wird [Chang et al. 1987; Chang et al. 1989; D. Y. Lee et al. 1997; Schmitt et al. 1993].

### 1.3.3 RNA/DNA-Hybride und Autoimmunität

Bei der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung Aicardi-Goutières-Syndrom handelt es sich um eine Enzephalopathie, die im klinischen Bild Ähnlichkeiten zu intrauterin erworbenen Virusinfektionen aufweist, obwohl keine Erreger nachgewiesen werden können. Mutationen der Gene für die Nukleasen TREX1 und RNase H2, die zu einer verminderten Enzymaktivität führen, lösen Akkumulationen von Nukleinsäurenebenprodukten aus [Crow et al. 2006a; Crow et al. 2006b; Crow et al. 2009]. Im Fall von RNase H2-Mutationen handelt es sich um RNA/DNA-Hybride. Diese Ansammlung von Nukleinsäuren löst Entzündungsreaktionen aus [Alarcón-Riquelme 2006; Rigby et al. 2008]. TREX1-Mutationen stehen außerdem im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses (SLE) und familial chilblain lupus [Lee-Kirsch et al. 2007a; Lee-Kirsch et al. 2007b]. Für TREX1 defiziente Mäuse konnte außerdem gezeigt werden, dass es aufgrund des fehlenden Abbaus zytoplasmatischer DNA, welcher von endogenen Retroelementen stammt, zu einer letalen Autoimmunität kommt, die durch erhöhte Produktion von Typ I Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst wird [Morita et al. 2004; Stetson et al. 2008].

## 1.4 TLR-basierte Adjuvantien

Für die Prävention verschiedener Infektionskrankheiten sind Impfstoffe von zentraler Bedeutung. Um eine adäquate Immunantwort zu gewährleisten, kommen Adjuvantien als pharmazeutische Hilfsstoffe zur Anwendung, welche die Wirkung eines Impfstoffes unspezifisch verstärken. Der Impfstoff selbst löst eine spezifische Immunantwort aus, die Stärke der Immunantwort wird aber maßgeblich durch das verwendete Adjuvans bestimmt.

Derzeit sind folgende Adjuvantien für die Verstärkung humaner Impfstoffe zugelassen: Aluminiumhydroxid, MF59, AS03 und AS04. Aluminiumhydroxid, welches in den 1920er Jahren entdeckt wurde, verstärkt die Antigenaufnahme durch antigenpräsentierende Zellen, verlängert die Antigenpräsentation und wirkt sich positiv auf die Aktivierung von T-Lymphozyten aus [Ghimire et al. 2012; McKee et al. 2013]. Es kommt als Adsorptionsmittel in inaktivierten Impfstoffen wie den Tetanus-, Diphtherie-, Pertussis- und Hepatitis A-Impfstoffen vor. MF59, welches in den 1990er Jahren entwickelt wurde, stellt nach Aluminiumhydroxid das zweite zugelassene Adjuvans dar. Es handelt sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion, welche Squalen, Polysorbat 80 und Sorbitantriöleat enthält. MF59 ist lymphgängig und be-

schleunigt die Antigenaufnahme durch Immunzellen. Es ist beispielsweise Bestandteil im Influenza-Impfstoff Flud. Bei AS03 handelt es sich ebenfalls um eine Öl-in-Wasser-Emulsion, die Squalen, Polysorbat 80 und DL- $\alpha$ -Tocopherol enthält. Dieses Adjuvans wird im Influenza-Impfstoff Pandemrix verwendet. Bei dem Adjuvans AS04 handelt es sich um ein sogenanntes kombiniertes Adjuvans. Ein Komplex aus Monophosphoryl-Lipid A (MPL) und Aluminiumhydroxid. MPL ist ein gereinigtes Derivat von Lipopolysacchariden aus Bakterienzellwänden von *Salmonella minnesota* und aktiviert TLR4. AS04 ist Bestandteil im Hepatitis B-Impfstoff Fendrix und im HPV (humane Papillomviren)-Impfstoff Cervarix.

Die Erforschung und Entwicklung neuer Adjuvantien ist von großer Bedeutung, um ein Repertoire an Wirkverstärkern zur Verfügung zu stellen, welches die gezielte Induktion humoraler oder zellulärer Immunantworten ermöglicht. Die Sicherheit von Adjuvantien besitzt oberste Priorität. Dennoch steht beispielsweise der Impfstoff Pandemrix im Verdacht bei Kindern Narkolepsie auszulösen [Nohynek et al. 2012; Partinen et al. 2012].

Sowohl natürliche als auch synthetische TLR-Liganden besitzen das Potential als Adjuvantien eingesetzt zu werden und befinden sich bereits in der experimentellen Verwendung. Außerdem weiß man heute, dass TLR-Liganden schon seit Beginn der Impfstoffentwicklung unwissentlich als Wirkverstärker enthalten waren. Der Gelbfieberimpfstoff YF-17D, ein attenuierter Lebendimpfstoff, gehört zu den effektivsten Vakzinen und aktiviert verschiedene dendritische Zelltypen über TLR2, TLR7, TLR8 und TLR9. Dadurch werden Zytokine wie IL-12, IL-6 und IFN $\alpha$  induziert [Querec et al. 2006]. Die eingeleitete adaptive Immunantwort ist zum einen charakterisiert durch ein Th1-/Th2-Zytokinprofil und zum anderen durch antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Außerdem spielt das Adaptermolekül MyD88 hier eine entscheidende Rolle in der Einleitung der Th1-Antwort. Die außerordentliche Effektivität spiegelt sich auch darin wider, dass eine einzige Impfdosis bei 99 % der immunisierten Menschen ausreichenden Schutz vor Gelbfieber bietet. Antikörper konnten sogar 35 Jahre nach der Immunisierung nachgewiesen werden [Poland et al. 1981]. Dieses Musterbeispiel zeigt außerdem, dass eine Kombination verschiedener TLR-Liganden als Adjuvans enormes Potential besitzen könnte. Im Tiermodell konnten bereits erste Daten zur simultanen Verwendung von TLR2/6-, TLR3- und TLR9-Liganden erhoben werden [Zhu et al. 2010].

Liganden für TLR7 und TLR8 wurden bisher nicht als Wirkverstärker in Impfstoffen erprobt. Dennoch werden Imiquimod und Resiquimod in der medizinischen Therapie verwendet. Imiquimod wird beispielsweise zur Behandlung von Basal-

zellkarzinomen, durch HPV ausgelöste Nicht-Genitalwarzen, und zur Behandlung von Lentigo maligna eingesetzt [Gupta et al. 2004]. Es kommt zur lokalen Induktion von  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IL-12. Des Weiteren wird eine zytotoxische T-Lymphozyten-Antwort eingeleitet.

Synthetisch hergestellte immunstimulatorische CpG DNA-Sequenzen werden beispielsweise in der Entwicklung von Hepatitis B- und Influenza-Impfstoffen erprobt. Im klinischen Test wurde ein kommerzieller Hepatitis B-Impfstoff mit der entsprechenden immunstimulatorischen DNA-Sequenz supplementiert und Testpersonen intramuskulär injiziert. HBsAG-spezifische Antikörper konnten bei diesen Probanden deutlich früher nachgewiesen werden als in den Kontrollgruppen. Außerdem konnten unter den Testpersonen deutlich höhere Raten an zytotoxischen T-Lymphozyten beobachtet werden [Halperin et al. 2006]. Sogar für immunsupprimierte HIV-infizierte Patienten konnte gezeigt werden, dass ein TLR9-Ligand als Adjuvans in einem Pneumokokken-Impfstoff hervorragende Erfolge erzielen kann [Søgaard et al. 2010].

Um effektive TLR-basierte Adjuvantien zu generieren, muss deren Aufnahme in Immunzellen mit Hilfe geeigneter Transport- bzw. Transfektionsmechanismen forciert werden. Verschiedene Zwei- oder Mehrkomponentensysteme wie Liposomen oder Aluminiumgele finden Verwendung. Für MPL-ähnliche Moleküle wurde bereits gezeigt, dass die zelluläre Aufnahme deutlich erhöht wird, wenn Aggregatkomplexe und keine Monomere transportiert werden.

Transfektionsreagenzien, welche TLR-Liganden an ihren Wirkort transportieren, dürfen selbst keine Nebenwirkungen sowie Zellschädigungen auslösen. Derzeit gibt es eine Reihe liposomaler Transfektionsreagenzien, welche die zelluläre Aufnahme der TLR-Liganden induzieren bzw. beschleunigen. Liposomen sind vesikuläre Strukturen, welche durch die Akkumulation von untereinander interagierenden Lipiden gebildet werden. In der Gruppe der kationischen Lipide sind insbesondere die Transfektionsreagenzien N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) [Felgner et al. 1987], [1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trimethylammonio)propane] (DOTAP) [Leventis et al. 1990], 3 $\beta$ [N-(N', N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol (DC-Chol) [X. Gao et al. 1991] und dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS) [Behr et al. 1989] von Bedeutung. Kationische Lipide bilden mit negativ geladenen Nukleinsäuren Lipoplexe aus [Wasungu et al. 2006]. Jedes Lipid besitzt eigene strukturelle Aspekte wie die Größe der Kopfgruppe und der Länge des Kohlenwasserstoffrestes. Die positiv geladene Kopfgruppe ist sowohl für Interaktionen mit den negativ geladenen Nukleinsäuren als auch für die Bindung des Lipoplexes an die Zellmembran verantwortlich. Die anschließende Aufnahme der Lipoplexe in die

Zelle erfolgt durch Endozytose oder endozytoseähnliche Mechanismen [Elouahabi et al. 2005; Pires et al. 1999].

## 1.5 Zielsetzung

Das angeborene Immunsystem detektiert virale und bakterielle Nukleinsäuren über pattern recognition receptors (PRR). Einzel- und doppelsträngige RNA und DNA wurden bisher als Liganden für diese Rezeptoren beschrieben. RNA/DNA-Hybride sind beispielsweise Bestandteil viraler, bakterieller sowie mitochondrialer Genome oder werden während viraler bzw. retroviraler Replikationszyklen transient gebildet. Außerdem ist ein Zusammenhang zwischen einem unzureichenden Abbau von endogenen Nukleinsäurespezies und der daraus resultierenden Akkumulation von RNA/DNA-Hybriden und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wahrscheinlich. Das immunstimulatorische Potential von RNA/DNA-Hybriden wurde bisher nicht ausreichend untersucht.

Durch die Auswahl viraler bzw. retroviraler Sequenzen, welche Bestandteil von RNA/DNA-Hybriden sind, soll deren immunstimulatorisches Potential in humanen sowie murinen Immunzellen untersucht werden. Der für die Detektion verantwortliche Rezeptor wird durch Verwendung rezeptordefizienter Mausstämmen identifiziert. Des Weiteren soll die direkte Rezeptor-Liganden-Interaktion in einer Bindungsstudie nachgewiesen werden. Dazu wird die extrazelluläre Rezeptordomäne rekombinant hergestellt und die spezifische Bindung von RNA/DNA-Hybriden verifiziert.

Außerdem wird das immunstimulatorische Potential von Genomen analysiert, welche RNA/DNA-Hybrid-Strukturen aufweisen. Mitochondriale, virale und bakterielle Genome sollen unter diesem Gesichtspunkt näher untersucht werden. Nachfolgend sollen primäre Immunzellen retroviral infiziert und fluoreszenzmikroskopisch auf die Akkumulation von RNA/DNA-Hybriden hin untersucht werden.

Durch die nähere Charakterisierung des RNA/DNA-Hybrid-detektierenden Rezeptors könnten innovative therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung von viralen Infektionen oder auch Autoimmunerkrankungen abgeleitet werden.

In einem weiteren Themenkomplex soll das Potential von cholesterolkonjugierter synthetischer immunstimulatorischer RNA [Heil et al. 2004] für die Verwendung als Adjuvans analysiert werden. Adjuvantien sind als Wirkverstärker für Impfstoffe von essentieller Bedeutung. Derzeit gibt es nur wenige für den Menschen zugelassene Substanzen, wodurch sich ein weiterer Forschungsbedarf für nebenwirkungsfreie Adjuvantien ergibt. RNA40 wurde bereits als Ligand für TLR7 beschrieben und

besitzt somit prinzipiell das Potential als Adjuvans Verwendung zu finden. Derzeit muss jedoch ein Transfektionsreagenz eingesetzt werden, um RNA40 an ihren Wirkort zu bringen. Die Verwendung solcher Reagenzien zeigt häufig unerwünschte Effekte wie z. B. Zelltod. Die Kopplung eines TLR-Liganden an eine natürlicherweise im menschlichen Körper vorkommende Substanz wie Cholesterol sollte schädliche Auswirkungen minimieren.

Das immunstimulatorische Potential von cholesterolkonjugierte RNA40 wird im Vergleich zur bekannten dotapvermittelten Transfektionsmethode analysiert. Dazu werden murine Immunzellen differenziert, die zelluläre Aufnahme von RNA40 durchflusszytometrisch untersucht und die Sezernierung von Zytokinen mittels ELISA nachgewiesen. Des Weiteren muss ein immunstimulatorischer Effekt durch Cholesterol selbst ausgeschlossen werden können. Für diese Untersuchung wird ein nicht-stimulativer cholesterolgekoppelter Ligand verwendet.

---

# KAPITEL 2

---

## Material

### 2.1 Geräte

**Tabelle 2.1:** Geräte

Gerät	Modell	Firma/Firmensitz
Analysewaage	R160P-D1	Satorius GmbH, Göttingen
Analysewaage	H51-D	Satorius GmbH, Göttingen
Autoklav	Provit 2200	Holzner GmbH, Nussloch
Durchflusszytometer	FACS Calibur	Becton Dickinson, Basel
Eismaschine	AF 10	Scotsman Ice Systems, Ipswich, UK
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M mit Apotome	Carl Zeiss, Oberkochen
FPLC-System		Pharmacia, Uppsala, Sweden
Gefrierschrank	Liebherr comfort	Liebherr, Ochsenhausen
Heizblock	TS-100 Thermoshaker	PeqLab, Erlangen
Inkubator	HERA cell 240	Heraeus, Hanau
Konfokales Laserscan-Mikroskop	TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlschrank		Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph, Schwabach

Gerät	Modell	Firma/Firmensitz
Mikroliterpipetten		Abimed, Langenfeld
Mikroliterpipetten		Eppendorf, Hamburg
Mikroplattenwaschgerät	Skan Washer 400	Molecular Devices, Ismaning
Mikroskop (Durchlicht)	Labovort	Leitz, Bielefeld
PAA- Gelektrophoresekammer	Perfect Blue Twin S	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	pH523	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe	Pipetboy comfort	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenphotometer	Emax	Molecular Devices, Ismaning
Präzisionswaage	P1000	Mettler Toledo, Gießen
RT-PCR-Cycler	Mini Opticon MJ Mini	Biorad, Hercules, USA
Rüttler (vortexen)	REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Spannungsquelle	PowerPack 300	Biorad, Hercules, USA
Spektrophotometer	NanoDrop-1000	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Sterilwerkbank	Hera safe	Heraeus, Hanau
Sterilwerkbank	LaminAir HLB 2448	Heraeus, Hanau
Stickstofftank	Chronos	Messner, Griesheim
Thermocycler (PCR-Maschine)	C1000 Thermal cycler	Biorad, Hercules, USA
Tischzentrifuge	Picofuge	Stratagene, Amsterdam, NL
Ultrazentrifuge	Optima L-100K Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Wasserbad		Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen
Zählkammer	Neubauer	W. Schreck, Hofheim
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Biofuge stratos	Heraeus, Hanau



Gerät	Modell	Firma/Firmensitz
Zentrifuge	J2-21	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Multifuge 1L-R	Heraeus, Hanau
Zytozentrifuge	Cytospin 2	Shandon, England

## 2.2 Chemikalien

**Tabelle 2.2:** Chemikalien

Chemikalie	Firma/Firmensitz
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Agarose „UltraPure <sup>TM</sup> “	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid, $\text{NH}_4\text{Cl}$	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat, APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Bovine Serum Albumin, BSA	Roth, Karlsruhe
CHAPS (3-[(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat, DEPC	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glyzerol	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid, $\text{KCl}$	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat, $\text{KHCO}_3$	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Firma/Firmensitz
Kaliumhydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2$	Roth, Karlsruhe
MES	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, $\text{NaCl}$	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat, SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphatdihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Roth, Karlsruhe
Natronlauge, 1N	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Polybrene	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schwefelsäure, $\text{H}_2\text{SO}_4$	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin, TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
TrisBase	Roth, Karlsruhe
TrisHCl	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Serva, Heidelberg
Tween20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid, 30 % $\text{H}_2\text{O}_2$	AppliChem, Darmstadt
Zitronensäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Merck, Darmstadt

## 2.3 Reagenzien

**Tabelle 2.3:** Reagenzien

Reagenz	Firma/Firmensitz
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Merck, Darmstadt
DNA ladder 100 bp, Gene Ruler	Thermo Scientific, Waltham, USA
DNase	Roche, Mannheim
DOTAP Transfection Reagent	Roth, Karlsruhe
FMS-like Tyrosinkinase3 Ligand, Überstand Flt3L exprimierender CHO-Zellen	Eigenproduktion
GelCode Blue Stain Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA
IFN $\alpha$ , human, rekombinant	Peptotech, Hamburg
IFN $\alpha$ , murin, rekombinant	Hycult Biotech, Uden, NL
IL-6, human, rekombinant	ImmunoTools, Friesoythe
IL-6, murin, rekombinant	R&D Biosystems, Wiesbaden
IP-10, murin, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Loading Dye Solution, 6 x	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mowiol	Roth, Karlsruhe
OPD-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
PageBlue Protein Staining Solution	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteaseinhibitorcocktail	Thermo Scientific, Waltham, USA
Protein A	Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Proteinmarker (prestained)	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase H	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNase, DNase-free	Roche, Mannheim
Streptavidin-Peroxidase-Konjugat	Roche, Mannheim
SybrGold Nucleic Acid Gel Stain	Life technologies, Carlsbad, USA
TNF $\alpha$ , murin, rekombinant	PeptoTech, Rocky Hill, USA

## 2.4 Puffer

**Tabelle 2.4:** Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	50 mM MES, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 5,5
Blockpuffer (ELISA)	1 % BSA, 0,05 % Tween20 in 1 x PBS
Dulbecco's PBS	PAA, Cölbe
Elutionspuffer (Affinitätschromatographie)	100 mM Glycin, pH 3,0
Erythrozytenlysepuffer	150 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM EDTA, pH 7,2
FACS Cell Wash	BD Biosciences, USA
FACS Clean	BD Biosciences, USA
FACS Flow	BD Biosciences, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, USA
FACS-Flow	0,001 % Na-Azid in 1 x PBS
FACS-Puffer	2 % FCS in PBS <sup>def</sup>
IB <sub>c</sub> Puffer (Mitochondrienisolation)	0,01 M Tris/MOPS, 0,001 M EGTA/Tris, 0,2 M Sucrose, pH 7,4
Lämmli-Probenpuffer, 6 x	12 % SDS, 12,5 % 2-Mercaptoethanol, 60 % Glyzerol, 0,375 mM TrisBase, pH 6,8 mit HCl einstellen, gesättigte Bromphenolblaulösung zugeben
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Liposomenpuffer, 1 x	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,1 % DEPC, pH 7,4; 3 h rühren, 2 x autoklavieren
Liposomenpuffer, 2 x	40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 0,1 % DEPC, pH 7,4; 3 h rühren, 2 x autoklavieren
Taillysepuffer (Mausschwänze, Bakterien, Mitochondrien)	10 mM TrisHCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS in H <sub>2</sub> O u. p.

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer (Zelllysate)	1 x Liposomenpuffer, 1 % CHAPS, Proteaseinhibitorcocktail (1 Tablette/10 ml Puffer)
MES-Puffer (Schmelzkurvenanalyse)	20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 5,5
PBS, 10 x	2,7 mM KCl, 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 mM NaCl, 6,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4
pH-Ausgleichspuffer (Affinitätschromatographie)	1,5 M Tris, pH 8,6
RNase H, 10 x Reaction Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris, 10 % SDS, pH 6,8
Saponinpuffer	1 % BSA, 0,5 % Saponin in PBS <sup>def</sup>
Substratpuffer (ELISA)	38 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , 66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , pH 5,0
TAE-Puffer, 50 x	40 mM TrisBase, 0,1 % Essigsäure, 0,1 mM EDTA in $\text{H}_2\text{O}$
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris, 10 % SDS, pH 8,8
Waschpuffer (ELISA)	0,05 % Tween20 in 1 x PBS

## 2.5 Medien und Zellkultur

**Tabelle 2.5:** Zusätze

Zusatz	Firma/Firmensitz
2-Mercaptoethanol	Life technologies, Carlsbad, USA
AB-Serum	Biochrom AG, Berlin
Amino Acids, non-essential, 100 x	PAA, Cölbe
DMEM (high glucose 4,5 g/l without L-Glutamine)	PAA, Cölbe
Fetal calf serum, FCS	Life technologies, Carlsbad, USA
humanes AB-Serum	Sigma Aldrich, München
L-Glutamin, 200 mM (100 x)	PAA, Cölbe
LB-Medium ( <i>E.coli</i> -Kultur)	Roth, Karlsruhe

Zusatz	Firma/Firmensitz
Lymphozytenseparationsmedium	PAA, Cölbe
OptiMEM	Life technologies, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA, Cölbe
RPMI1640	PAA, Cölbe
Sodium Pyruvat Solution, 100 mM	PAA, Cölbe
Trypsin-EDTA, 10 x (5 mg/ml Trypsin; 2,2 mg/ml EDTA)	PAA, Cölbe

**Tabelle 2.6:** Medien supplementiert

Medium	Zusammensetzung
OptiMEM supp. Flt3L (murine Flt3L-Kultur)	100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 % FCS, 0,1 % 2-Mercaptoethanol
RPMI supp. PBMC (humane PBMC-Kultur)	2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 x Aminosäuren, 1 mM Sodium Pyruvat Solution, 2 % AB-Serum
DMEM supp. 10 % FCS	2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS, 0,1 % 2-Mercaptoethanol

## 2.6 Bakterien

**Tabelle 2.7:** Bakterien

Bakterium	Quelle
<i>E.coli</i> Wildtyp, DH5 $\alpha$	Eigenbestand
<i>E.coli</i> MIC2067	Mitsuhiro Itaya, Professor Laboratory of Genome Designing Biology, Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Japan

## 2.7 Medien Bakterienkultur

**Tabelle 2.8:** Medien Bakterienkultur

Medium	Firma/Firmensitz
LB-Medium	Roth, Karlsruhe

## 2.8 Kits

**Tabelle 2.9:** Kits

Kit	Firma/Firmensitz
LongRange PCR Kit	Qiagen, Hilden
Murine IP-10 ELISA Kit	PeproTech, Rocky Hill, USA
Murine TNF $\alpha$ ELISA Kit	PeproTech, Rocky Hill, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo, Scientific, Waltham, USA

## 2.9 Antikörper

**Tabelle 2.10:** Zytokin- bzw. Interferon-ELISA

Antikörper	Firma/Firmensitz
goat anti-mouse TNF $\alpha$	PeproTech, Rocky Hill, USA
goat anti-mouse TNF $\alpha$ , biotinylated	PeproTech, Rocky Hill, USA
mouse anti-human IFN $\alpha$	eBioscience, San Diego, USA
mouse anti-human IFN $\alpha$	eBioscience, San Diego, USA
HRP-conjugate	
rabbit anti-mouse IFN $\alpha$	PBL, Interferon Source, Piscataway, USA
rabbit anti-mouse IP-10	PeproTech, Rocky Hill, USA
rabbit anti-mouse IP-10, biotinylated	PeproTech, Rocky Hill, USA
rat anti-human IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg
rat anti-human IL-6, biotinylated	BD Pharmingen, Heidelberg
rat anti-mouse IFN $\alpha$	PBL, Interferon Source, Piscataway, USA
rat anti-mouse IL-6	R&D Systems, Minneapolis, USA
rat anti-mouse IL-6, biotinylated	R&D Systems, Minneapolis, USA

**Tabelle 2.11:** Nukleinsäure-ELISA

Antikörper	Firma/Firmensitz
goat anti-mouse IgG, HRP-conjugate	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
S9.6 anti-RNA/DNA-Hybrid (mIgG2a)	überlassen von Gabor Szabo, University of Debrecen, Hungary



**Tabelle 2.12: Fc-ELISA**

Antikörper	Firma/Firmensitz
AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc $\gamma$ Fragment Specific	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc $\gamma$ Fragment Specific	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

**Tabelle 2.13: FACS**

Antikörper	Firma/Firmensitz
Fc-Block, rat	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
rat anti-mouse B220, FITC	BD Bioscience, San Jose, USA
rat anti-mouse CD11c, APC	eBioscience, San Diego, USA
rat anti-mouse Siglec-H, PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

**Tabelle 2.14: Immunfluoreszenz**

Antikörper	Firma/Firmensitz
goat anti-mouse IgG, Alexa568	Life technologies, Carlsbad, USA
S9.6 anti-RNA/DNA-Hybrid (mIgG2a)	überlassen von Gabor Szabo, University of Debrecen, Hungary

## 2.10 Stimulanzen

**Tabelle 2.15:** Stimulanzen

Stimulus	Sequenz 5' → 3'	Firma/Firmensitz
ssRNA CMV27 (19mer)	CCC GGG CAG GGU GGC GGG A	IBA, Göttingen
ssDNA CMV27 (19mer)	TCC CGC CAC CCT GCC CGG G	IBA, Göttingen
ssRNA CMV63 (20mer)	AGG GCG GAC GGA GGG CGG GA	IBA, Göttingen
ssDNA CMV63 (20mer)	TCC CGC CCT CCG TCC GCC CT	IBA, Göttingen
ssRNA HIVPPT (18mer)	UAA AAG AAA AGG GGG GAC	IBA, Göttingen
ssDNA HIVPPT (18mer)	GTC CCC CCT TTT CTT TTA	IBA, Göttingen
ssRNA MuLV43 (43mer)	CUG CAU UGA UUG AAU CUG UCC UCA CCA CCC ACC AGC CCA CCU G	IBA, Göttingen
ssDNA MuLV43 (43mer)	CAG GTG GGC TGG TGG GTG GTG AGG ACA GAT TCA ATC AAT GCA G	IBA, Göttingen
ssRNA40 sense (20mer)	GCC CGU CUG UUG UGU GAC UC	IBA, Göttingen
ssRNA40 antisense (20mer)	GAG UCA CAC AAC AGA CGG GC	IBA, Göttingen
CpG1668 PTO (20mer)	TsCsCs AsTsGs AsCsGs TsTsCs CsTsGs AsTsGs CsT	TIB Molbiol, Berlin
CpG2216 PTO (20mer)	GsGsG GGA CGA TCG TCsG sGsGsG sGsG	TIB Molbiol, Berlin

s=thiolmodifizierte Phosphatgruppen

Stimulus	Sequenz 5 ' $\longrightarrow$ 3 '	Firma/Firmensitz
HCMV	Genom	Prof. Dr. med. Hartmut Hengel, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Freiburg
HCMV	BAC (bacterial artificial chromosome)	Prof. Dr. med. Hartmut Hengel, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Freiburg

## 2.11 Primer

**Tabelle 2.16:** Primer

Primer	Sequenz 5 ' $\longrightarrow$ 3 '	Firma/Firmensitz
LR PCR, forward	GAA CTA GTA CCG CAA GGG AAA GAT GAA AGA C	Eurofins, MWG Operon, Ebersberg
LR PCR, reverse	CAC ACT TTC CAG TAT GCT TAC CTT GTT ACG AC	Eurofins, MWG Operon, Ebersberg

## 2.12 Viren

**Tabelle 2.17:** Viren

Virus	Quelle
Mo-MuLV ZAP (GFP-markierter Moloney-MuLV)	Dr. Philipp Yu, Institut für Immunologie, Marburg

## 2.13 Mausstämme

**Tabelle 2.18:** Mausstämme

Mausstamm	Quelle
C57BL/6 Wildtyp	Animal facility, BMFZ, Marburg
DAP12 <sup>-/-</sup> auf C57BL/6 Hintergrund	Animal facility, Universität Freiburg
Siglec H <sup>-/-</sup> auf C57BL/6 Hintergrund	Animal facility, Universität Erlangen-Nürnberg
TLR7 <sup>-/-</sup> auf C57BL/6 Hintergrund	Animal facility, BMFZ, Marburg
TLR9 <sup>-/-</sup> auf C57BL/6 Hintergrund	Animal facility, BMFZ, Marburg

## 2.14 Zelllinien

**Tabelle 2.19:** Zelllinien

Zelllinie	Literatur
HEK293	ATCC CRL-1573
HEK293, stabil mTLR2 exprimierend	[Rutz et al. 2004]
HEK293, stabil mTLR9 exprimierend	[Rutz et al. 2004]

## 2.15 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.20:** Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma/Firmensitz
6-well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-well Platte, Primaria	BD Bioscience, San Jose, USA
96-well Flachbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well Maxisorp Platte	Nunc Thermo Fisher Scientific, Denmark
96-well Rundbodenplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-well Rundbodenplatte, microlon, unsteril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Amicon Ultra-15 centrifugal filter devices 50 000 NMWL	Millipore, Billerica, USA
Deckgläschen	Thermo Scientific, Wilmington, USA
FACS-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Filterspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Peqlab, Erlangen
Handschuhe	NOBA Verbandmittel, Wetter
Kanülen (20 G, 21 G, 24 G)	BD Bioscience, Heidelberg
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatte (96-well Flachbodenplatte)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pasteurpipette	Assistent, Sondheim
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biostep, Jahnsdorf
Reaktionsgefäß 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Spitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Slide-A-Lyzer-Dialysis cassettes 3,5 MWCO	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Spritze „Omnifix“ (10 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,45 µm und 0,22 µm	Sigma-Aldrich, München
Streifentubes, klar; mit klaren Deckeln	Biorad, Hercules, USA

Produkt	Firma/Firmensitz
Vakuumfilter Stericup Filter Units	Millipore, Billerica, USA
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (14,5 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (Primaria, 10 cm für Flt3L-Kultur)	BD Bioscience, San Jose, USA
Zellsieb 70 µm Nylon	Falcon Becton Dickinson, USA
Zentrifugenröhrchen (für JA-14 und JLA-16250)	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Zentrifugenröhrchen (für SW41-Rotor)	Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA

## 2.16 Software

**Tabelle 2.21:** Software

Software	Firma/Firmensitz
AxioVision	Carl Zeiss, Oberkochen
Cell Quest Pro	BD Bioscience, San Jose, USA
Flow Jo	Tree Star, Ashland, USA
JabRef reference manager	Open Source, GPL lizenziert
LAS AF	Leica Microsystems, Wetzlar
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
MiKTeX	Christian Schenk
Omega Data Analysis	BMG Labtech, Ortenberg
Open Office	Open Source, Apache Software Foundation
SigmaPlot 10.0	Systat Software, Chicago, USA
SoftMax Pro V5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
TeXnicCenter	Open Source, The TeXnicCenter Team, GPL lizenziert

---

# KAPITEL 3

---

## Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNA. Die Reaktion wird von einer DNA-Polymerase katalysiert und durch Verwendung von Primern, welche für das gewünschte Amplifikat spezifisch sind, initiiert. Der Begriff „Kettenreaktion“ beschreibt die Tatsache, dass die PCR-Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus verwendet werden und somit eine exponentielle Vervielfältigung möglich wird.

Zur Vervielfältigung mitochondrialer Genome wurde das „LongRange PCR Kit“ von Qiagen verwendet.

**Tabelle 3.1:** PCR-Ansatz LongRange PCR

Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
LongRange PCR Buffer	10 x	1 x
dNTP Mix	10 m M each	500 µM each
Primer sense	100 pmol/µl	0,4 pmol/µl
Primer antisense	100 pmol/µl	0,4 pmol/µl
LongRange PCR	-	2 Units/50 µl
Enzyme Mix		
DNA	-	0,5 µl
H <sub>2</sub> O u. p.	-	ad 50 µl

**Tabelle 3.2:** PCR-Bedingungen LongRange PCR

PCR-Zyklus	Temperatur	Zeitspanne
1	93 °C	3 min
2	93 °C	15 s
3	62 °C	30 s
4	68 °C	16 min
5	Go to „2“	+ 10 Zyklen
6	93 °C	15 s
7	62 °C	30 s
8	68 °C	16 min
9	Go to „6“	+ 28 Zyklen
10	12 °C	∞

### 3.1.2 Genomextraktion aus *E. coli*-Kulturen

Um **E. coli**-Genome für Stimulationsexperimente verwenden zu können, wurden die Bakterien zunächst lysiert und verdaut. Anschließend wurde das Genom mit Isopropanol gefällt. Wildtyp *E. coli* wurden in LB-Medium kultiviert und *E. coli* MIC2067 in LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin und 25 µg/ml Chloramphenicol.

- Pelletieren der Kultur (20 ml-Kultur):  $\odot$  2680 g, 10 min, 4 °C
- Verwerfen des ÜS
- Zugabe von 25 ml Taillysepuffer und 100 µg/ml Proteinase K
- ü. N. bei 56 °C inkubieren
- $\odot$  2680 g, 30 min, 4 °C
- Zugabe von 25 ml Isopropanol, invertieren (DNA-Fällung)
- Überführung der DNA mit Hilfe eines sterilen Holzstäbchens in 25 ml 75 % Ethanol



- $\odot$  2680 g, 10 min, 4 °C
- Verwerfen des ÜS
- Trocknung der Pellets
- 1 ml H<sub>2</sub>O u. p. auf das Pellet geben und quellen lassen
- Konzentrationsbestimmung am „NanoDrop-1000“
- Lagerung bei 4 °C

### 3.1.3 Genomextraktion aus gereinigten Mitochondrien

Zur Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials mitochondrialer Genome wurden zunächst Mitochondrien isoliert (3.6). Es folgte die Lyse der Mitochondrien und anschließend wurde das mitochondriale Genom aufgereinigt.

- Aufnahme der Mitochondrien in Taillysepuffer und Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K
- ü. N. bei 56 °C inkubieren
- Zugabe desselben Volumens Phenol-Chloroform-Isoamylalkohols und 30 s invertieren
- $\odot$  10 000 g, 10 min, 4 °C
- Abnahme der oberen Phase und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe desselben Volumens Chloroform und 30 s invertieren
- $\odot$  10 000 g, 10 min, 4 °C
- Abnahme der oberen Phase und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß
- Zugabe desselben Volumens Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,0), 30 s invertieren
- Abnahme der oberen Phase und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß
- $\odot$  10 000 g, 10 min, 4 °C
- Waschen des Genoms mit 75 % igem Ethanol

- $\odot$  10 000 g, 10 min, 4 °C
- Abnahme des ÜS
- Trocknung des Pellets
- Quellung und Aufnahme des Pellets in geeignetem Volumen H<sub>2</sub>O u. p.
- Konzentrationsbestimmung am „NanoDrop-1000“
- Lagerung bei 4 °C

### 3.1.4 Messung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden photometrisch am „NanoDrop-1000“ gemessen. Die aromatischen Ringe der Basen von Nukleinsäuren oder auch einzelner Nukleotide absorbieren UV-Strahlen mit einer Wellenlänge von 260 nm. Die optische Dichte bei dieser Wellenlänge kann zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration herangezogen werden. Es wurde jeweils 1 µl der unverdünnten Probe verwendet.

### 3.1.5 Herstellung doppelsträngiger Nukleinsäuren

Für die Stimulationsexperimente wurden aus verschiedenen, synthetisch hergestellten, einzelsträngigen Nukleinsäuren in einer Annealing- bzw. Hybridisierungsreaktion Doppelstränge gebildet. Komplementäre Einzelstränge wurden in äquimolaren Verhältnissen gemischt und anschließend für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Einzelstränge zu linearisieren. Anschließend erfolgte eine langsame Abkühlung des Reaktionsansatzes bis auf Raumtemperatur. Während der Abkühlung lagerten sich die komplementären Stränge aneinander, wodurch ein doppelsträngiges Endprodukt entstand. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden am „NanoDrop-1000“ ermittelt. Des Weiteren wurden die Doppelstränge qualitativ mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse untersucht. RNA/DNA-Hybride wurden zusätzlich durch den RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörper S9.6 nachgewiesen. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

**Tabelle 3.3:** Ansatz zur Herstellung von doppelsträngigen Nukleinsäuren

Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
Liposomenpuffer	2 x	1 x
Nukleinsäure- Einzelstrang 1	100 pmol/ $\mu$ l	20 pmol/ $\mu$ l
Nukleinsäure- Einzelstrang 2	100 pmol/ $\mu$ l	20 pmol/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O u. p.	-	ad 150 $\mu$ l

### 3.1.6 Schmelzkurvenanalyse von doppelsträngigen Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann die Doppelsträngigkeit von Nukleinsäuren überprüft werden. Die hergestellten doppelsträngigen Nukleinsäuren wurden für die Analyse mit SYBRGold, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, versetzt und in einem RT-PCR-Cycler kontinuierlich von 23 °C auf 99 °C erhitzt, wobei es zu einer temperaturabhängigen Dissoziation der beiden Stränge kam. Waren beide Stränge aneinandergelagert, war das Fluoreszenzsignal am stärksten. Durch den Temperaturanstieg fiel das Fluoreszenzsignal stetig ab und bei Erreichen der Schmelztemperatur  $T_m$  (temperature of melting) liegen 50 % der Doppelstränge als Einzelstränge vor und es lässt sich der stärkste Abfall des Fluoreszenzsignals beobachten. Trägt man die negative erste Ableitung der Schmelzkurve gegen die Temperatur auf, wird die Schmelztemperatur als Hochpunkt sichtbar und kann abgelesen werden. Die doppelsträngigen Nukleinsäuren wurden entweder in Liposomenpuffer verdünnt, welcher mit einem pH-Wert von 7,4 dem physiologischen pH-Wert des Zytoplasmas entspricht, oder in MES-Puffer, welcher mit einem pH-Wert von 5,5 das saurere Milieu des endosomalen Kompartiments simuliert.

**Tabelle 3.4:** Ansatz zur Schmelzkurvenanalyse von doppelsträngigen Nukleinsäuren

Substanz	Stockkonzentration	Endkonzentration
doppelsträngige Nukleinsäure	-	0,1 µg/µl
SYBRGold	10 000 x	1 x
Liposomenpuffer pH 7,4 / MES-Puffer pH 5,5	-	ad 50 µl

### 3.1.7 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamidgelelektrophorese dient in dieser Arbeit der Auftrennung von Nukleinsäuren im elektrischen Feld. Die Nukleinsäuren wandern dabei durch eine Gelmatrix, welche aus einem Gemisch von Acrylamid und Bisacrylamid besteht. In Anwesenheit freier Radikale bildet Acrylamid in einer Kettenreaktion lange Polymere, welche durch Bisacrylamid quervernetzt werden. Als Katalysator dieser Reaktion dient Tetramethylethyldiamin (TEMED) und als Radikalbildner kommt Ammoniumperoxodisulfat (APS) zum Einsatz. Auf diese Weise entsteht ein festes Gel.

Das Laufverhalten der verschiedenen einzelsträngigen und doppelsträngigen Nukleinsäuren konnte differenziert und gleichzeitig die Herstellung der Doppelstränge kontrolliert werden. Aufgrund der relativ kurzen Länge der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurden 15 % ige Polyacrylamidgele hergestellt.

**Tabelle 3.5:** Ansatz für ein 15 % iges Polyacrylamidgel

Substanz	Volumen
Bis-Acrylamid (30 % w/v)	3,5 ml
TAE-Puffer, 50 x	0,14 ml
APS, 20 %	0,0175 ml
TEMED	0,011 ml
H <sub>2</sub> O u. p.	ad 7 ml

Um möglichst scharfe Bande zu erhalten, wurden die Nukleinsäuren in einem Gesamtvolumen von 3  $\mu$ l auf das Gel aufgetragen. Dabei wurden jeweils 300 ng der entsprechenden Nukleinsäuren mit „6x Loading Dye Solution“ versetzt und mit H<sub>2</sub>O u. p. aufgefüllt. Als Laufpuffer diente 1x TAE- Puffer. Nach einem ca. 1,5 –stündigen Lauf bei 100 V wurden die Gele mit SybrGold (1:10 000 in TAE-Puffer verdünnt) gefärbt und analysiert.

## 3.2 Biochemische Methoden

### 3.2.1 Aufreinigung von TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteinen

Um TLR-Liganden-Interaktionen in einer Bindungsstudie untersuchen zu können, wurden zunächst TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine aufgereinigt. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in stabil transfizierten HEK-Zellen, welche expandiert und lysiert wurden. Schließlich wurden die Fusionsproteine aus den Zelllysaten mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Fusionsproteine wurden an eine Protein A-Säule gebunden, welche eine hohe Affinität zum hIgG-Fc-Teil besitzt. Die gebundenen Fusionsproteine wurden im Anschluss durch Absenkung des pH-Wertes von der Säule eluiert.

- Aufnahme der Zellpellets in Lysepuffer (2 ml Lysepuffer/14,5 cm-Kulturschale) mit anschließender Rotation für 1 h bei 4 °C
- $\odot$  3350 g, 30 min, 4 °C
- Abnahme des ÜS
- Sterilfiltration des ÜS (0,22  $\mu$ m-Filter)
- Ultrafiltration des Lysates (50 000 NMWL),  $\odot$  3800 g, 5 –6 h, 8 °C
- Zelllysate nochmals steril filtrieren (0,22  $\mu$ m-Filter)

Affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine

- Äquilibration der Protein A-Säule mit Lysepuffer
- Beladung der Säule mit Zelllysate
- Spülung der Säule mit Lysepuffer
- Elution der Fusionsproteine mit Elutionspuffer

- Auffangen der Fusionsproteine in 1,5 ml Reaktionsgefäße (pH-Ausgleichspuffer vorgelegt, um einen pH-Wert von 6,5 zu erhalten)
- Dialyse (Slide-A-Lyzer Dialysis cassettes), ü. N. bei 4 °C

Die Proteinkonzentration wurde mit dem „Pierce BCA Protein Assay Kit“ bestimmt.

### 3.2.2 BCA-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen säulenchromatographisch aufgereinigten TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine wurde das „BCA Protein Assay Kit“ laut Herstellerangaben verwendet. Bei der BCA-Reaktion reagieren zweiwertige Kupferionen mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen, welche in Kombination mit der Bicinchoninsäure zu einem Farbumschlag von grün zu violett führen. Somit kann durch photometrische Auswertung die Proteinkonzentration bestimmt werden.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der säulenchromatographisch aufgereinigten TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine wurde die denaturierende SDS-PAGE verwendet. Zum methodischen Hintergrund siehe auch 3.1.7.

Die Proben wurden mit 6x Lämmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 96 °C aufgeköcht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zunächst erfolgte ein Einlaufen der Proben für 30 Minuten bei 70 V. Anschließend wurden die Proben bei 100 V für 1,5 Stunden aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der „PageRuler Prestained Protein Ladder 10–170 kDa“ verwendet, die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (GelCode Blue Stain Reagent) gefärbt und mit VE-Wasser entfärbt.

**Tabelle 3.6:** Ansatz für ein 7,5 % iges SDS-Polyacrylamidgel

Substanz	Volumen
<b>Sammelgel</b>	
Bis-Acrylamid (30 % w/v)	0,33 ml
Sammelgel-Puffer	0,27 ml
APS, 20 %	0,01 ml
TEMED	0,002 ml

Substanz	Volumen
H <sub>2</sub> O u. p.	ad 2 ml
<b>Trenngel</b>	
Bis-Acrylamid (30 % w/v)	1,25 ml
Trenngel-Puffer	1,35 ml
APS, 20 %	0,025 ml
TEMED	0,004 ml
H <sub>2</sub> O u. p.	ad 5 ml

### 3.2.4 Bindungsstudie

Ein ELISA-basierter Versuchsaufbau wurde eingesetzt, um Rezeptor- (TLR9) Liganden- (RNA/DNA-Hybrid) Interaktionen zu analysieren. Die aus HEK-Zellen aufgereinigten TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine wurden durch immobilisiertes Protein A an „Maxisorp“-Platten gebunden. Die Bindung potentieller biotinylierter Liganden (biotinylierte Nukleinsäuren) konnte durch ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat nachgewiesen werden. Da TLR im sauren endosomalen Kompartiment auf ihre Liganden treffen, wurde für die Bindungsstudie ein Puffer mit pH 5,5 verwendet.

#### Kurzprotokoll

- Immobilisierung von Protein A ü. N. 4 °C
- Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-haltigem Blockpuffer für 1 h bei RT
- Zugabe des TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteines und anschließende Inkubation für 1,5 h bei RT
- Zugabe der biotinylierten Nukleinsäuren und Inkubation für 1,5 h bei RT
- Zugabe des Enzymkonjugates (Streptavidin-POD) und 30 min Inkubation bei RT
- Zugabe der Substratlösung und Abstoppen der Reaktion nach ausreichendem Farbumschlag mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Protein A wurde in PBS<sup>def</sup> verdünnt. Fusionsproteine, Nukleinsäuren und das Enzymkonjugat wurden in Bindungspuffer verdünnt. Das Auftragsvolumen betrug 50 µl. Das Abstoppen der Meerrettichperoxidase-Reaktion erfolgte mit 25 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Zwischen allen Schritten wurden die Platten dreimal mit 250 µl Bindungspuffer/0,05 % Tween20 pro well gewaschen. Für die Substratlösung wurde eine o-Phenylendiamin-Tablette (20 mg) in 20 ml Substratpuffer gelöst und anschließend 20 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben.

Im ELISA-Reader wurden die Absorptionswerte der einzelnen Proben bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und anschließend mit den Programmen „SoftMax Pro V5“ und „SigmaPlot 10.0“ ausgewertet.

**Tabelle 3.7:** Weitere Angaben zur Durchführung der Bindungsstudie

Substanz	Endkonzentration
Protein A	1 µg/ml
TLR-hIgG-Fc-Fusionsprotein	1 µg/ml
biotinylierte Nukleinsäure	0,5 µM, 0,1 µM, . . .
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD 0,1 U/ml

### 3.2.5 Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay (ELISA)

Der sogenannte „Sandwich“-ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe Antigene über Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen und eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen werden können. Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve ist es möglich, die genaue Antigenmenge zu bestimmen. In dieser Arbeit kamen ELISA-basierte Systeme zum Nachweis verschiedener Antigene (Zytokine bzw. Interferone, Nukleinsäuren, Rezeptoren) und zur Untersuchung von Liganden-Rezeptor-Bindungen zur Anwendung.

#### 3.2.5.1 Zytokin-ELISA

Der Zytokin- bzw. Interferon-ELISA wurde verwendet, um Konzentrationen von Zytokinen bzw. Interferonen in Zellüberständen zu messen.

Im ersten Schritt wurden Antikörper (Erst- oder Capture- Antikörper), die für das entsprechende Antigen spezifisch sind, an die Oberfläche einer 96-well-Flach-



bodenplatte „Maxisorp“ (Nunc) adsorbiert. Diese Platten sind aufgrund einer speziellen Polystyrolbeschichtung in der Lage die Erst-Antikörper zu binden. Durch Inkubation der Erst-Antikörper mit den Zellüberständen der *in vitro* Stimulationen kommt es zur Bindung des Antigens aus den Zellüberständen an die immobilisierten Erst-Antikörper. Diese Antigene wiederum werden im Folgenden durch einen Zweit-Antikörper detektiert. Der Zweit-Antikörper war entweder direkt mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, was einer direkten Markierung entspricht, oder es erfolgte eine indirekte Markierung des Zweit-Antikörpers. Bei dieser wurde anstelle des Enzyms das Vitamin Biotin an den Zweit-Antikörper gebunden, welches wiederum durch ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat detektiert wurde. Im letzten Schritt wurde die Substratlösung, die neben einem chromogenen Substrat (o-Phenylendiamin) auch Wasserstoffperoxid enthielt, zugegeben. Die Meerrettichperoxidase setzt das Wasserstoffperoxid zu Wasser um, wobei das eigentlich farblose Substrat als Elektronendonator dient, der im Verlauf der Reaktion zu einem farbigen Reaktionsprodukt oxidiert wird. Die Reaktion wurde nach einer ca. 20-minütigen Inkubation im Dunkeln mit 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  abgestoppt. Der Farbumschlag wurde photometrisch detektiert.

Um eine quantitative Bestimmung des im Zellüberstand enthaltenen Zytokins oder Interferons durchzuführen, wurde eine Standardreihe von elf Standards mit bekannter Antigenkonzentration hergestellt. Mit Hilfe dieser Standardreihe konnte eine Kalibrierungskurve erstellt werden und somit war es möglich, die Konzentrationen der Zytokine oder Interferone im Zellüberstand zu quantifizieren.

Im ELISA-Reader wurden die Absorptionswerte der einzelnen Proben bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und anschließend mit den Programmen „SoftMax Pro V5“ und „SigmaPlot 10.0“ ausgewertet.

Es wurden ELISA für  $\text{IFN}\alpha$  und IL-6 im humanen sowie für  $\text{IFN}\alpha$ , IL-6,  $\text{TNF}\alpha$  und IP-10 im murinen System durchgeführt.

Die Verdünnung des Erst-Antikörpers erfolgte in  $\text{PBS}^{\text{def}}$ . Alle weiteren Antikörperlösungen und Standards wurden in Blockpuffer angesetzt. Das Auftragsvolumen für Antikörperlösungen, Standards, Zellüberstände und Substratlösung betrug 50  $\mu\text{l}$  und das Abstoppen der Meerrettichperoxidasereaktion erfolgte mit 25  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Zwischen allen Schritten wurden die Platten dreimal mit 250  $\mu\text{l}$  Waschpuffer/well gewaschen und somit überschüssige Antikörper oder nicht gebundene Bestandteile der Zellüberstände entfernt.

## Kurzprotokoll

- Immobilisierung der Erst-Antikörper ü. N. bei 4 °C oder bei RT
- Absättigung von freien unspezifischen Bindungsstellen der Erst-Antikörper mit BSA-haltigem Blockpuffer für 1 h bei RT
- Auftragen der Standardreihe und der Zellüberstände mit anschließender Inkubation für 1-2 h bei RT
- Zugabe des Zweit-Antikörpers und Inkubation für 1-2 h bei RT
- Zugabe des Enzymkonjugates und Inkubation für 30 min bei RT
- Zugabe der Substratlösung und Abstoppen der Reaktion nach ausreichendem Farbumschlag mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Tabelle 3.8:** Weitere Angaben zur Durchführung der ELISA

<b>IFN<math>\alpha</math>, human</b>	
Erst-Antikörper	anti-human IFN $\alpha$ coating antibody [0,1 $\mu$ g/ml]
1. Standard	humanes IFN $\alpha$ [4 ng/ml]
Zweit-Antikörper, enzymkonjugiert	anti-human IFN $\alpha$ monoclonal antibody, HRP-conjugated (1:1000)
<b>IL-6, human</b>	
Erst-Antikörper	purified rat anti-human IL-6 [0,5 $\mu$ g/ml]
1. Standard	recombinant human IL-6 [10 ng/ml]
Zweit-Antikörper	rat anti-human IL-6, biotinylated [0,5 $\mu$ g/ml]
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD [0,1 U/ml]
<b>IFN<math>\alpha</math>, murin</b>	
Erst-Antikörper	rat monoclonal anti-mouse IFN $\alpha$ (RMMA-1) [1 $\mu$ g/ml]
1. Standard	murines IFN $\alpha$ [500 U/ml]
Zweit-Antikörper	rabbit polyclonal anti-mouse IFN $\alpha$ [0,94 $\mu$ g/ml]

Enzymkonjugat	Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) [0,16 µg/ml]
<b>IL-6, murin</b>	
Erst-Antikörper	Mouse IL-6 MAb (Clone MP5-20F3), Rat IgG1 [1 µg/ml]
1. Standard	recombinant mouse IL-6 [10 ng/ml]
Zweit-Antikörper	Mouse IL-6 Biotinylated Affinity Purified PAb, Goat IgG [0,1 µg/ml]
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD [0,1 U/ml]
<b>TNF<math>\alpha</math>, murin</b>	
Erst-Antikörper	goat anti-mTNF $\alpha$ [1 µg/ml]
1. Standard	recombinant mTNF $\alpha$ [2 ng/ml]
Zweit-Antikörper	biotinylated goat anti-mTNF $\alpha$ [0,25 µg/ml]
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD [0,1 U/ml]
<b>IP-10, murin</b>	
Erst-Antikörper	rabbit anti-mIP-10 [0,5 µg/ml]
1. Standard	recombinant mIP-10 [2 ng/ml]
Zweit-Antikörper	biotinylated rabbit anti-mIP-10 [0,25 µg/ml]
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD [0,1 U/ml]

Für die Substratlösung wurde eine o-Phenylendiamin-Tablette (20 mg) in 20 ml Substratpuffer gelöst und anschließend 20 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben.

### 3.2.5.2 Nukleinsäure-ELISA

Der in dieser Dissertation durchgeführte Nukleinsäure-ELISA diente der Kontrolle der generierten RNA/DNA-Hybride. Er beruht auf dem wie unter 3.2.5.1 beschriebenen Prinzip des Zytokin- bzw. Interferon-ELISA.

#### Kurzprotokoll

- Immobilisierung von Streptavidin ü. N. bei 4 °C

- Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-haltigem Blockpuffer für 1 h bei RT
- Auftragen der biotinmarkierten Nukleinsäuren mit anschließender Inkubation für 1,5 h bei RT
- Zugabe des RNA/DNA-Hybrid spezifischen Antikörpers S9.6
- Zugabe des enzymkonjugierten Antikörpers goat anti-mouse IgG-POD
- Zugabe der Substratlösung und Abstoppen der Reaktion nach ausreichendem Farbumschlag mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Um RNA/DNA-Hybride in Genomen (Mitochondrien, *E. coli*) nachzuweisen, wurden die Genome immobilisiert und die RNA/DNA-Hybride durch den S9.6 Antikörper nachgewiesen.

Streptavidin wurde in PBS<sup>def</sup> verdünnt aufgetragen. Alle weiteren Nukleinsäure- und Antikörperlösungen wurden in Blockpuffer angesetzt. Das Auftragsvolumen betrug generell 50 µl. Das Abstoppen der Meerrettichperoxidasereaktion erfolgte mit 25 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zwischen allen Schritten wurden die Platten dreimal mit 250 µl Waschpuffer/well gewaschen. Im ELISA-Reader wurden die Absorptionswerte der einzelnen Proben bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und anschließend mit den Programmen „SoftMax Pro V5“ und „SigmaPlot 10.0“ ausgewertet.

**Tabelle 3.9:** Weitere Angaben zur Durchführung des Nukleinsäure-ELISA

Substanz	Endkonzentration
Streptavidin	1 µg/ml
Nukleinsäure, biotinyliert	0,5 µM
S9.6 anti-RNA/DNA-Hybrid	2 µg/ml
Antikörper	
mouse IgG	2 µg/ml
goat anti-mouse IgG HRP-conjugate	1:20 000

Für die Substratlösung wurde eine o-Phenylendiamin-Tablette (20 mg) in 20 ml Substratpuffer gelöst und anschließend 20 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben.

Es wurde keine Standardreihe mitgeführt. Die Konzentrationen der verwendeten Nukleinsäuren war bekannt, deshalb wurden die OD-Werte zur Auswertung herangezogen.

Das aufgetragene Volumen für die Antikörper- sowie die Substratlösungen betrug 50 µl und die enzymatische Reaktion wurde am Ende analog zum Zytokin-ELISA mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt.

### 3.2.5.3 TLR-hIgG-Fc-Fusionsprotein-ELISA

Zum Nachweis der rekombinanten TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine wurde ein ELISA-basiertes System eingesetzt. Die Fusionsproteine wurden von stabil transfizierten HEK-Zellen produziert und die lysierten Zellpellets analysiert [Rutz et al. 2004].

#### Kurzprotokoll

- Immobilisierung des Erst-Antikörpers ü. N. bei 4 °C
- Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA-haltigem Blockpuffer für 1 h bei RT
- Auftragen der Proben und Inkubation für 1,5 h bei RT
- Zugabe des biotinylierten Zweit-Antikörpers mit anschließender Inkubation für 1,5 h bei RT
- Zugabe des Enzymkonjugates (Streptavidin-POD) und 30 min Inkubation bei RT
- Zugabe der Substratlösung und Abstoppen der Reaktion nach ausreichendem Farbumschlag mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Für die Substratlösung wurde eine o-Phenylendiamin-Tablette (20 mg) in 20 ml Substratpuffer gelöst und anschließend 20 µl 30 % iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugegeben. Der Erst-Antikörper wurde in PBS<sup>def</sup> verdünnt aufgetragen. Alle weiteren Antikörperlösungen wurden in Blockpuffer angesetzt. Das Auftragsvolumen betrug generell 50 µl. Das Abstoppen der Meerrettichperoxidasereaktion erfolgte mit 25 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Tabelle 3.10:** Weitere Angaben zur Durchführung des Fc-ELISA

Substanz	Bezeichnung [Endkonzentration]
Erst-Antikörper	AffiniPure Goat-Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific [1 µg/ml]
Zweit-Antikörper	Biotin-SP-AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific [0,06 µg/ml]
Enzymkonjugat	Streptavidin-POD [0,1 U/ml]

Zwischen allen Schritten wurden die Platten dreimal mit 250 µl Waschpuffer/well gewaschen.

Es wurde keine Standardreihe mitgeführt. Zur Auswertung wurden die OD-Werte herangezogen.

Im ELISA- Reader wurden die Absorptionswerte der einzelnen Proben bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen und anschließend mit den Programmen „SoftMax Pro V5“ und „SigmaPlot 10.0“ ausgewertet.

### 3.3 Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden unter einer laminar flow Sterilbank der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Alle benötigten Materialien sowie sämtliche Medien, Reagenzien und Lösungen wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen hergestellt bzw. gehandhabt. Die Kultivierung von Zellen in RPMI1640 sowie in Opti-MEM erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellkultivierung in DMEM hingegen bei 37 °C, 7,5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Zentrifugationsschritte wurden in einer Zentrifuge des Typs Heraeus Multifuge 1L-R durchgeführt.

#### 3.3.1 Zellzählung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die in Einzelzellsuspension befindlichen Zellen wurden entsprechend verdünnt, mit Trypanblau (Endkonzentration 0,25 %) versetzt und 10 µl dieser Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Daraufhin wurden die lebenden Zellen in den vier äußeren

Quadranten der Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen} \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Quadrantenzahl}}$$

### 3.3.2 Isolation von Peripheral Blood Mononuclear Cells

Blut kann in Blutplasma und zelluläre Bestandteile gegliedert werden. Die zelluläre Komponente beinhaltet die kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten und außerdem kernhaltige Leukozyten. Zu den Leukozyten zählen neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. Mit Hilfe der Ficoll-Hypaque-Methode können die peripheren mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), zu welchen Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen und in geringen Mengen auch dendritische Zellen gehören, isoliert werden. Bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten aus Vollblutspenden entstehen sogenannte „Buffy-Coats“ als Nebenprodukt. Diese „Buffy-Coats“ wurden aus der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Gießen/Marburg bezogen und dienten als Ausgangsmaterial für die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen nach oben genannter Methode. Die Ficoll-Hypaque-Methode beruht auf einer Dichtegradientenzentrifugation. Da das verwendete Lymphozytenseparationsmedium bei 20 °C eine Dichte von 1,079 g/ml besitzt, sammeln sich die peripheren mononukleären Zellen, die eine geringere Dichte aufweisen, über dem Separationsmedium an (Leukozytenring). Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen hingegen besitzen eine größere Dichte als das Separationsmedium und befinden sich dementsprechend nach der Zentrifugation am Boden des Röhrchens.

- Vorlegen von 13 ml Lymphozytenseparationsmedium in ein 50 ml Reaktionsgefäß
- Überschichtung des Lymphozytenseparationsmediums mit 1/3 Volumen eines „Buffy-Coats“
- $\odot$  670 g, 30 min, 20 °C, ohne Bremse
- Verwerfen des Plasmas
- Abnehmen des Leukozytenringes und Überführung in zwei weitere 50 ml Reaktionsgefäße
- Auffüllen auf 50 ml mit kaltem PBS<sup>def</sup>

- $\odot$  350 g, 10 min, 4 °C
- Resuspendieren und Vereinigen der Zellpellets in einem 50 ml Reaktionsgefäß
- Auffüllen auf 50 ml mit kaltem PBS<sup>def</sup>
- $\odot$  350 g, 10 min, 4 °C
- Aufnahme des Zellpellets in entsprechendem Volumen RPMI supp. PBMC
- Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Bis zur weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension auf Eis aufbewahrt.

### 3.3.3 Präparation von murinem Knochenmark

Die Versuchsmäuse wurden durch zervikale Dislokation fachgerecht getötet, nachfolgend auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70 % igem Ethanol desinfiziert. Das Präparationsbesteck wurde in 70 % igem Ethanol bereitgestellt, Proben und Medium wurden kalt gehalten und steril gehandhabt. Das Knochenmark beider Hinterbeine einer Maus wurde für die Kultivierung und Differenzierung verwendet. Dazu wurden Femora und Tibiae beider Hinterbeine von Haut und Muskeln befreit. Bei der anschließenden Entnahme der Hinterbeine wurde stets darauf geachtet, dass die Epiphysen der Knochen verschlossen blieben. Alle weiteren Schritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

- Entfernung beider Epiphysen und Ausspülen des Knochenmarks mit Hilfe einer 24 G Kanüle und einer 10 ml Spritze
- Herstellung einer Einzelzellsuspension durch Resuspendieren mit einer 10 ml Pipette
- Überführung der Einzelzellsuspension durch ein Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß
- $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C
- Verwerfen des ÜS
- Aufnahme des Zellpellets in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer mit anschließender Inkubation für 7 min bei RT (osmotisches Zerplatzen der Erythrozyten)
- Zugabe von 5 ml Opti-MEM supp.



- $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C
- Aufnahme des Zellpellets in 5ml Opti-MEM supp.
- Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

Bis zur weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension auf Eis aufbewahrt.

### 3.3.4 Kultivierung und Differenzierung von Flt3L-Kulturen

Unter Einfluss des Zellproliferations- und Differenzierungsfaktors Flt3L (Fms-like tyrosine kinase 3 ligand) wurden murine Knochenmarkzellen *in vitro* zu einer Mischkultur aus konventionellen dendritischen Zellen (cDC) und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) differenziert [Brasel et al. 2000].

Die Knochenmarkzellen (3.3.3) wurden an Tag 0 in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml Opti-MEM supp. in Primaria Zellkulturschalen ausgesät. Pro Zellkulturschale wurden 10 ml Zellsuspension verwendet und diese mit Flt3L (Zellüberstand von stabil Flt3L-exprimierenden CHO-Zellen) in einer Endverdünnung von 1:250 versetzt. Nach einer Kultivierungs- und Differenzierungsdauer von acht Tagen wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, gewaschen ( $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C) und in entsprechendem Volumen Opti-MEM supp. aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer (3.3.1) bestimmt. Im Anschluss wurde der Differenzierungsstatus (Oberflächenmarker B220 und CD11c) der Zellen durchflusszytometrisch überprüft. Bis zur weiteren Verwendung in Stimulationsexperimenten oder Fluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt.

### 3.3.5 Stimulation von primären Zellen

Zur Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials der RNA/DNA-Hybride wurden Experimente mit humanen und murinen primären Zellen durchgeführt.

Die Stimulation von humanen PBMC erfolgte in 96-well Flachbodenplatten. Pro well wurden  $0,3 \cdot 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l Zellsuspension ausgesät. Murine Flt3L-Kulturen wurden in 96-well Rundbodenplatten zu einer Zellzahl von  $0,2 \cdot 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l Zellsuspension ausplattiert. Stimulationen erfolgten in Doppelbestimmungen und die jeweiligen Stimulationsansätze wurden in einem Volumen von 100  $\mu$ l/well hinzugegeben.

Die Zellen wurden mit RNA- und DNA-Einzelsträngen und den verschiedenen RNA/DNA-Hybriden mit den angegebenen Molaritäten stimuliert.

Um den Nukleinsäuren den Zugang zum endosomalen Kompartiment zu ermöglichen, wurde Dotap als liposomales Transfektionsreagenz verwendet. Dotap, ein kationisches Lipid, bildet mit negativ geladenen Nukleinsäuren spontan stabile Komplexe aus, die von den Zellen aufgenommen werden können [Felgner et al. 1987; Leventis et al. 1990].

Ansetzen einer 2 x konzentrierten Stimuluslösung

- Verdünnung des Stimulus zur jeweiligen Endkonzentration in Opti-MEM
- Zugabe des gleichen Volumens Dotap-MM (1:10 in Opti-MEM verdünnt) mit anschließender Inkubation für 10 min bei RT
- Zugabe des gleichen Volumens des entsprechenden Kulturmediums

Als Positivkontrollen bzw. interne Standards dienten verschiedene TLR-Liganden:

**Tabelle 3.11:** Interne Standards/Positivkontrollen

TLR-Ligand	Endkonzentration
CpG2216 PTO (TLR9)	1 $\mu$ M
RNA40 PD (TLR7)	0,75 $\mu$ M

CpG2216 wurde in Kulturmedium verdünnt. RNA40 wurde, wie die Nukleinsäurerestimuli, mit Dotap komplexiert. Das jeweilige Medium, sowie das Transfektionsreagenz wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

Die stimulierten Zellen wurden für 20 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Abnahme der Zellüberstände und deren weitere Analyse mittels ELISA (3.2.5.1) oder die intrazelluläre Fluoreszenzfärbung mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung (2.14). Die Archivierung der Überstände erfolgte bei –20 °C.

### 3.3.6 Retrovirale Infektion von primären Zellen

Primäre murine Immunzellen wurden durch Zentrifugation unter Verwendung von Polybrene mit GFP-markierten murinen Retroviren infiziert. Flt3L-induzierte Kulturen von dendritischen Zellen wurden an Tag 5 der Differenzierung infiziert.

- Überführen der Zellen in 50 ml Reaktionsgefäße

- $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C
- Aufnahme des Zellpellets in Kulturmedium
- Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauerzählkammer
- Ausplattieren von  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro well einer 6-well Platte, Zugabe der GFP-markierten murinen Retroviren, Zusetzen von 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Polybrene
- $\odot$  400 g, 90 min, 32 °C
- Inkubation für weitere 3 Tage

An Tag 8 wurden sowohl der Differenzierungsstatus (3.4.1) als auch der Infektionsstatus durchflusszytometrisch analysiert. Des Weiteren wurden die Zellen unter Verwendung des anti-RNA/DNA-Hybrid spezifischen Antikörpers S9.6 auf vorhandene RNA/DNA-Hybride untersucht (3.5).

### 3.3.7 Transfektion von primären Zellen mit cholesterolkonjugierten Nukleinsäuren

Im Rahmen dieser Dissertation wurden das Transfektionsvermögen, sowie das immunstimulatorisches Potential von cholesterolkonjugierter RNA40 untersucht und mit der bekannten Dotap vermittelten Transfektionsmethode verglichen.

Die Experimente erfolgten im 96-well Format. Zellzahlen und Volumen wurden analog zu 3.3.5 eingesetzt. Cholesterolkonjugierte RNA40 wurde entweder im entsprechenden Kulturmedium verdünnt oder zum Vergleich mit Dotap komplexiert (siehe auch 3.3.5). Sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen wurden standardmäßig mitgeführt.

Die Zellen wurden mit cholesterolkonjugierter RNA40 (einzel- oder doppelsträngig) in den jeweils genannten Molaritäten inkubiert. Zellüberstände wurden nach 20 h abgenommen und das Zytokin- bzw. Interferonprofil mittels ELISA (3.2.5.1) analysiert. Des Weiteren wurde das Transfektionsvermögen unter Verwendung von Alexa488-markierter, cholesterolkonjugierter RNA40 durchflusszytometrisch überprüft. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zusätzlich für spezifische Oberflächenmarker gefärbt (3.4.1).

### 3.3.8 Arbeiten mit Zelllinien

Das Passagieren der adhärenenten HEK293-ZELLEN erfolgte zweimal wöchentlich. Die Zellen wurden mit PBS<sup>def</sup> gewaschen und mit 1 x Trypsin/EDTA abgelöst. An-

schließlich wurden die Zellen in DMEM supp. 10 % FCS aufgenommen und im gewünschten Verhältnis passagiert.

## 3.4 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert werden. Zum einen können Aussagen über die Zellgröße (forward scatter (FSC)) und die Zellgranularität (sideward scatter (SSC)) getroffen werden und zum anderen ist es möglich, unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, bestimmte Oberflächenmarker der Zellen oder auch intrazellulär befindliche Proteine zu untersuchen. In Einzelzellsuspension befindliche Zellen werden an einem Laser vorbeigeführt und die charakteristischen Lichtsignale, die von den Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Granularität und ihrer spezifischen Anfärbung ausgesendet werden, werden von Detektoren gemessen.

### 3.4.1 Oberflächenfärbung für die Durchflusszytometrie

In dieser Arbeit kam die Färbung von Oberflächenmarkern zum Einsatz, um Zellen bezüglich ihres Differenzierungsstatus zu untersuchen.

- Überführung von  $0,3 \cdot 10^6$  Zellen in ein FACS-Röhrchen
- Waschen der Zellen mit FACS-Puffer
- Abnahme des ÜS
- Zugabe des Fc-Blocks mit anschließender Inkubation für 7 min bei 4 °C
- Zugabe der Antikörper-Lösung mit anschließender Inkubation für 30 min bei 4 °C im Dunkeln
- zweimaliges Waschen der Zellen mit FACS-Puffer
- Aufnahme des Zellpellets in 200 µl FACS-Puffer

Fc-Block und Antikörper-Lösungen wurden in FACS-Puffer verdünnt. Die Messung der Zellen erfolgte an einem Durchflusszytometer vom Typ „FACS Calibur“ unter Verwendung von „Cell Quest Pro“ (BD). Die aus der Messung resultierenden Daten wurden mit dem Programm „FlowJo“ ausgewertet.

**Tabelle 3.12:** Weitere Angaben zur Durchführung der Oberflächenfärbungen

Antikörper	Endkonzentration
Fc-Block, rat	5 µg/ml
rat anti-mouse B220, FITC	0,5 µg/ml
rat anti-mouse CD11c, APC	0,2 µg/ml

### 3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Sowohl retroviral infizierte Zellen (3.3.6) als auch mit synthetischen RNA/DNA-Hybriden transfizierte Zellen (3.3.5) wurden mit Hilfe des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 analysiert. Retroviral infizierte Zellen konnten somit auf RNA/DNA-Hybride als Replikationsintermediate untersucht werden und für die mit synthetischen Hybriden transfizierte Zellen konnte eine Aussage über die intrazelluläre Stabilität der Hybride getroffen werden.

- Überführen der Zellen in FACS-Röhrchen
- $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C
- Verwerfen des ÜS
- Fixierung der Zellen mit 2 % iger Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei RT
- zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS<sup>def</sup>
- Permeabilisierung der Zellen mit Saponinpuffer (1 % BSA, 0,5 % Saponin in PBS<sup>def</sup>) für 1 h bei RT
- Zugabe des S9.6-Antikörpers mit anschließender Inkubation für 1 h bei 4 °C im Dunkeln
- dreimaliges Waschen der Zellen mit Saponinpuffer
- Zugabe von DAPI und Zugabe des fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörpers mit anschließender Inkubation für 1 h bei 4 °C im Dunkeln
- dreimaliges Waschen der Zellen mit Saponinpuffer

- Waschen mit PBS<sup>def</sup>
- Aufbringen der Zellen auf einen Objektträger mit Hilfe der Zytocentrifugation
- Eindeckeln der Zellen mit Mowiol

Die Objektträger wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

**Tabelle 3.13:** Weitere Angaben zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen

Antikörper	Endkonzentration
S9.6 anti-RNA/DNA-Hybrid	2 µg/ml
Antikörper (mIgG2a)	
goat anti-mouse IgG, Alexa568	6,7 µg/ml
DAPI	0,1 µg/ml

### 3.6 Mitochondrienaufreinigung aus HEK-Zellen

Zur Analyse des immunstimulatorischen Potentials mitochondrialer Genome, welche RNA/DNA-Hybrid-Strukturen aufweisen, wurden zunächst Mitochondrien aus HEK-Zellen isoliert.

Nach der Überführung der HEK-Zellen in Reaktionsgefäße wurden sämtliche Schritte auf Eis durchgeführt.

- Überführung der HEK-Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäße
- $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C
- Verwerfen des ÜS
- Resuspendieren des Zellpellets in PBS<sup>def</sup>
- $\odot$  300 g, 7 min, 4 °C
- Aufnahme der Zellen in IB<sub>c</sub>-Puffer
- Zellsuspension mit Hilfe eines Glaspotters und eines Teflonmörser homogenisieren

- Überführung des Homogenisates in 15 ml Reaktionsgefäße
- $\odot$  600 g, 10 min, 4 °C
- Abnahme des ÜS und Überführung in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- $\odot$  7000 g, 10 min, 4 °C
- Verwerfen des ÜS
- Aufnahme des Pellets in IB<sub>c</sub>-Puffer
- $\odot$  7000 g, 10 min, 4 °C
- Resuspendieren des Pellets in IB<sub>c</sub>-Puffer und Zugabe von RNase, DNase-free (1:100)
- Suspension auf vorbereiteten Sucrose-Gradienten (1,5 M und 1 M Sucrose in SW41 Zentrifugenröhrchen) schichten
- $\odot$  50 000 g, 2 h, 4 °C
- Abnahme der Interphase mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer 21 G Kanüle
- Zugabe desselben Volumens IB<sub>c</sub>-Puffer
- $\odot$  10 000 g 10 min, 4 °C

Die Mitochondrien wurden anschließend verdaut und ihre Genome aufgereinigt (3.1.3).

---

# KAPITEL 4

---

## Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in zwei Themenschwerpunkte untergliedert. Im ersten Teil werden RNA/DNA-Hybride als neue Liganden, die eine Immunantwort über TLR9 induzieren, dargestellt. Der zweite Teil befasst sich mit der potentiellen Verwendung von cholesterolgekoppelter RNA40 als Adjuvans.

### **4.1 Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunität**

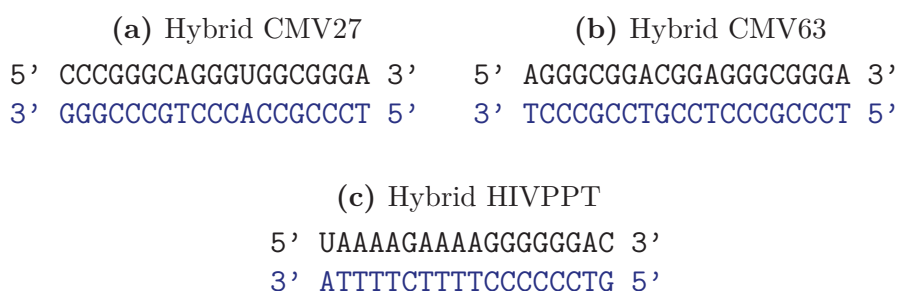
Um das immunstimulatorische Potential von RNA/DNA-Hybriden zu analysieren, wurden sowohl humane PBMC als auch murine Wildtyp und TLR-defiziente Flt3L-differenzierte dendritische Zellen (Flt3L-DC) mit den verschiedenen Hybriden stimuliert. RNA/DNA-Hybride wurden intrazellulär fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des anti-RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 nachgewiesen. Für die Experimente wurden Sequenzen aus dem lytischen Replikationsursprung (oriLyt) des humanen Zytomegalievirus (HCMV) und aus dem Polypurintrakt (PPT) des humanen Immundefizienzvirus (HIV) verwendet. Des Weiteren wurde eine Bindungsstudie durchgeführt, um die spezifische Interaktion zwischen RNA/DNA-Hybriden und TLR9 zu verifizieren.

#### **4.1.1 Synthetische RNA/DNA-Hybride induzieren eine Immunantwort in humanen PBMC**

Das immunstimulatorische Potential von RNA/DNA-Hybriden wurde zunächst im humanen System untersucht. Die Sequenzen der RNA/DNA-Hybride sind Abbildung 4.1 zu entnehmen. Es handelt sich um Originalsequenzen der viralen Geno-



me des humanen Zytomegalievirus (HCMV) und des humanen Immundefizienzvirus (HIV). Es wurden zwei Sequenzen aus dem lytischen Replikationsursprung (oriLyt) des HCMV (RNA/DNA-Hybrid CMV27 und RNA/DNA-Hybrid CMV63) und eine Sequenz aus dem Polypurintrakt des HIV (RNA/DNA-Hybrid HIVPPT) ausgewählt [Anders et al. 1992; Powell et al. 1996; Prichard et al. 1998]. Die Länge der RNA/DNA-Hybride beträgt 19 Basenpaare (bp) für Hybrid CMV27, 20 bp für Hybrid CMV63 und 18 bp für Hybrid HIVPPT.

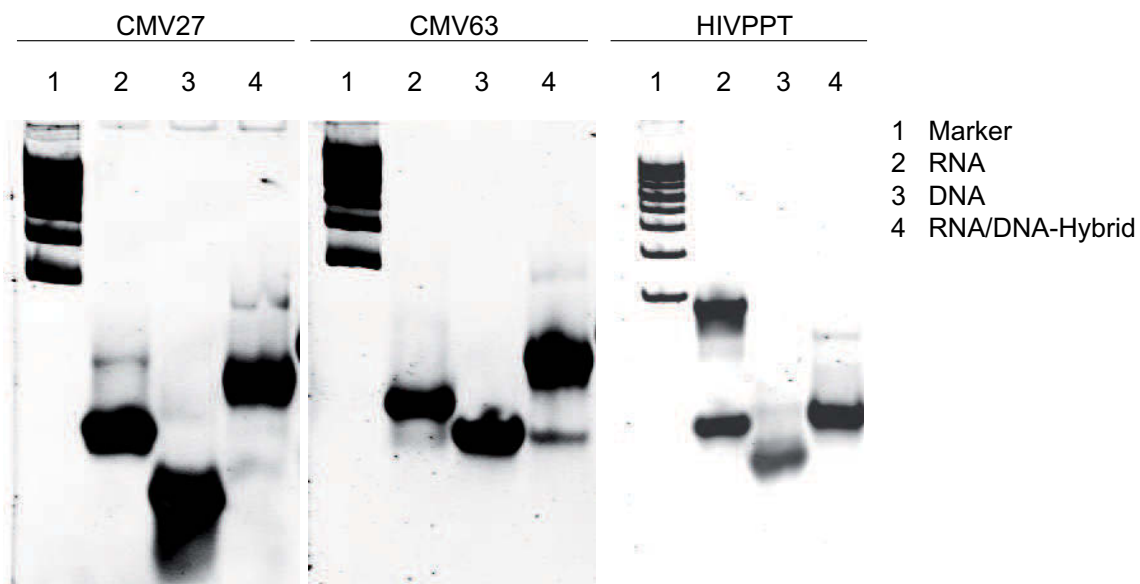


**Abbildung 4.1: Sequenzen der RNA/DNA-Hybride mit zugehörigen komplementären ssRNA (schwarz) und ssDNA (blau).** Die RNA/DNA-Hybride CMV27 (a) und CMV63 (b) stammen aus dem lytischen Replikationsursprung des HCMV, das RNA/DNA-Hybrid HIVPPT (c) stammt aus dem Polypurintrakt des HIV.

Komplementäre einzelsträngige (ss) RNA- und DNA-Phosphodiesteroligonukleotide wurden in äquimolaren Verhältnissen zu Doppelsträngen hybridisiert (3.1.5). Die Bildung von RNA/DNA-Hybriden wurde mit Hilfe der nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese (3.1.7), der Schmelzkurvenanalyse (3.1.6) und unter Verwendung des RNA/DNA-Hybrid spezifischen Antikörpers S9.6 in einem ELISA-basierten System (3.2.5.2) überprüft.

In der nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zeigten alle hergestellten RNA/DNA-Hybride eine effektive Hybridisierung, welche durch ein einheitliches Bandenmuster mit geringen Kontaminationen von ssRNA oder ssDNA gekennzeichnet war (Abbildung 4.2). RNA/DNA-Hybride als doppelsträngige Nukleinsäuren zeigten im Vergleich zu den korrespondierenden Einzelsträngen eine höher molekulare Bande. Die einzelsträngige RNA HIVPPT wies zwei Banden auf. Da die höher molekulare Bande nach erfolgter Hybridisierung nicht mehr vorhanden war, handelte es sich vermutlich um eine Sekundärstruktur der ssRNA HIVPPT.

Des Weiteren wurde die Hybridisierung unter Verwendung des anti-RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 validiert (3.2.5.2). Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte eindeutig gezeigt werden, dass RNA/DNA-Hybride generiert wurden.

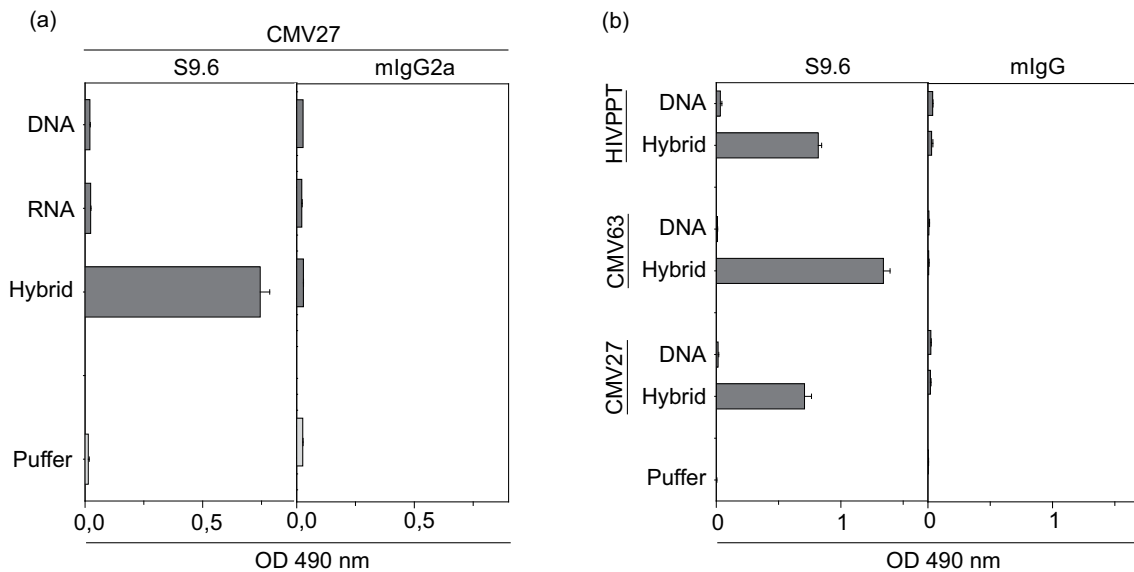


**Abbildung 4.2: Analyse der Hybridisierungsreaktionen mit Hilfe der nicht-denaturierenden PAGE.** 300 ng der entsprechenden Nukleinsäuren wurden auf ein 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte mit SybrGold. Repräsentativ für fünf unabhängige Hybridisierungsreaktionen.

Wie Abbildung 4.3a für Hybrid CMV27 zeigt, wurde ausschließlich das RNA/DNA-Hybrid und nicht die korrespondierenden ssRNA und ssDNA durch den S9.6 Antikörper detektiert. Die Isotypkontrolle zeigte keinerlei Bindung an Nukleinsäuren. Abbildung 4.3b zeigt den Nachweis der Hybride CMV27, CMV63 und HIVPPT mit Hilfe des S9.6 Antikörpers. Zur Kontrolle wurden hier nur die jeweiligen ssDNA mitgeführt, da nur diese im RNA/DNA-Hybrid eine Biotinmarkierung besaßen und somit zur Immobilisierung über Streptavidin an der ELISA-Platte beitrugen.

Um das immunstimulatorische Potential der Phosphodiester RNA/DNA-Hybride in Zellsystemen zu charakterisieren, müssen diese und ssRNA40 als Kontrollstimulus (TLR7-Ligand) mit dem kationischen Transfektionsreagenz Dotap komplexiert werden (3.3.5). Dadurch wird die zelluläre Aufnahme der Nukleinsäuren forciert und gleichzeitig vor allem ssRNA, welche höchst anfällig für den enzymatischen Abbau durch Nukleasen ist, geschützt [Capaccioli et al. 1993]. Der TLR9-Ligand CpG2216 wurde als weiterer Kontrollstimulus verwendet. Als Typ A CpG DNA besitzt CpG2216 am 3'-Ende einen Poly-G-Strang, welcher über Phosphothioatbindungen verknüpft ist. Somit wird zum einen die zelluläre Aufnahme vermittelt und zum anderen eine Resistenz gegen den enzymatischen Abbau durch Nukleasen gewährleistet.

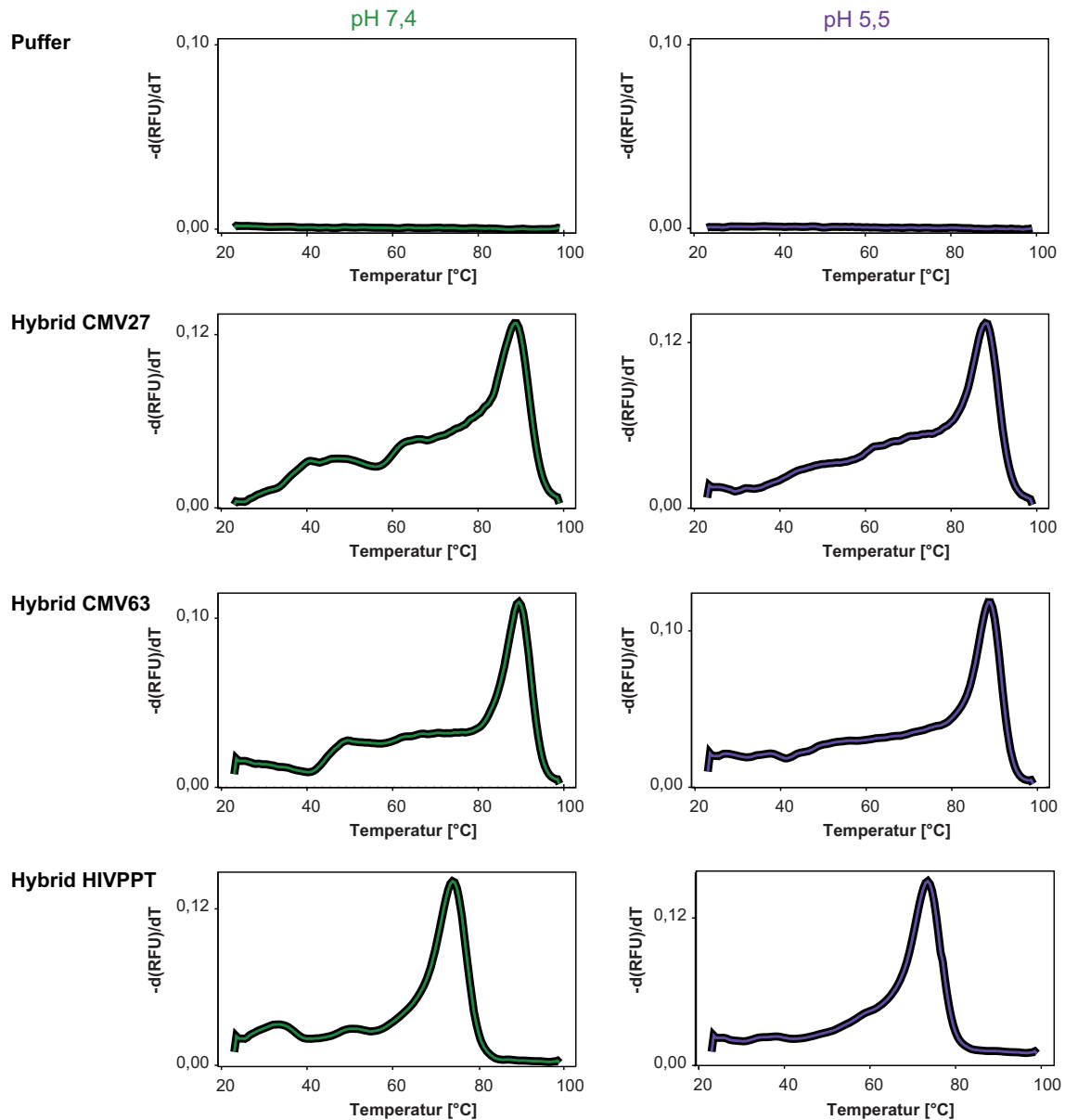
Die Komplexierung der Stimuli mit Dotap führt außerdem primär zu einer Trans-



**Abbildung 4.3: Verifizierung generierter RNA/DNA-Hybride.** Die Generierung von RNA/DNA-Hybriden wurde in einem ELISA-basierten System unter Verwendung des anti-RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 verifiziert. Biotin-markierte Nukleinsäuren wurden über die Bindung an Streptavidin immobilisiert und RNA/DNA-Hybride über den S9.6 Antikörper und einen peroxidasekonjugierten Detektionsantikörper nachgewiesen. Repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

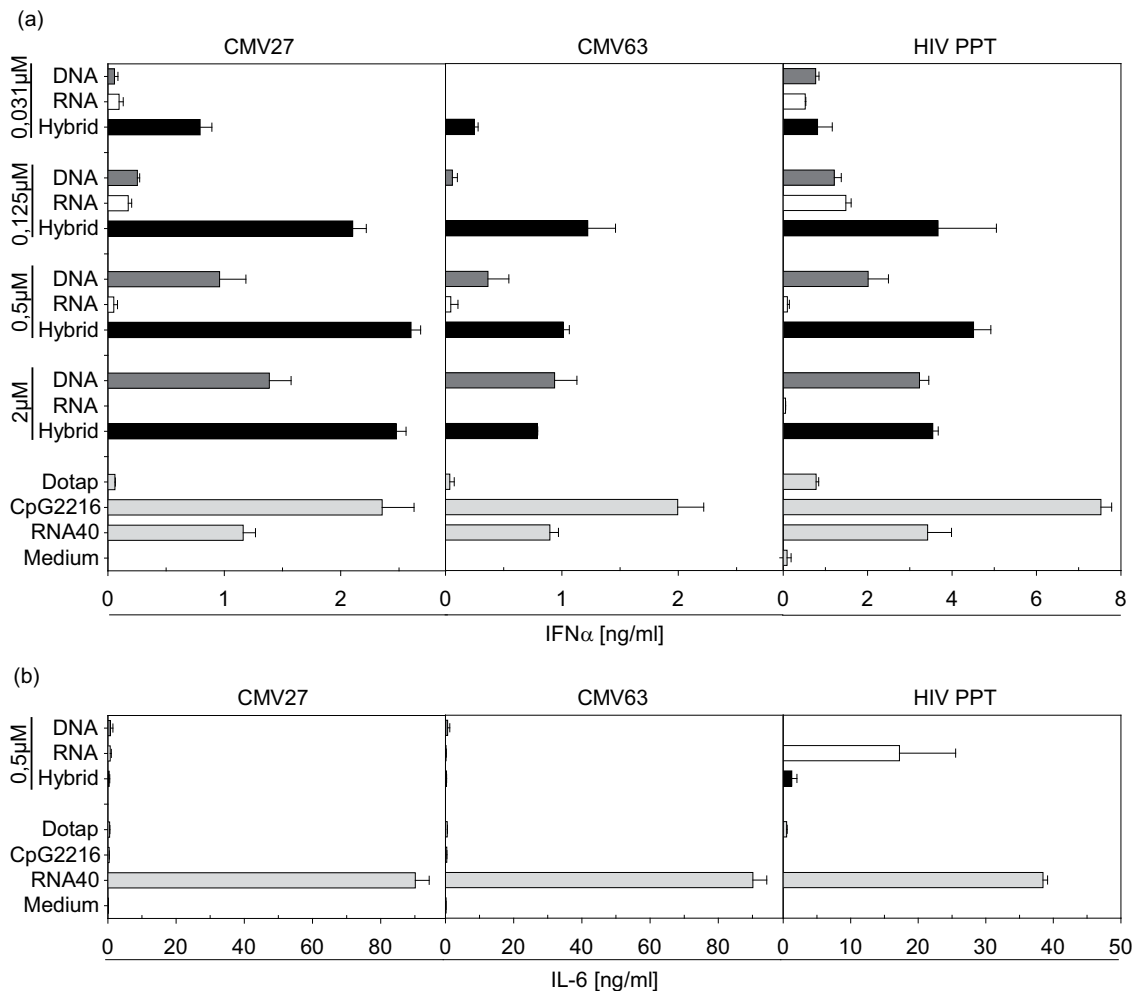
fektion in das endosomale Zellkompartiment, in welchem vor allem TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 exprimiert werden [Yasuda et al. 2005]. Aufgrund dessen wurden die RNA/DNA-Hybride in der Schmelzkurvenanalyse sowohl unter physiologischen (pH 7,4) als auch unter endosomal (pH 5,5) Bedingungen untersucht (3.1.6). Die Schmelztemperaturen aller RNA/DNA-Hybride lagen deutlich über 37 °C, wodurch gezeigt werden konnte, dass keine temperaturbedingte Dissoziation der Doppelstränge während der Inkubationszeiten der Stimulationsexperimente erfolgte. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass ein pH-Wert von 5,5, wie er im endosomal Kompartiment vorliegt, eine Dissoziation der Doppelstränge bewirkt, da die Schmelztemperaturen für beide pH-Bedingungen nahezu identisch waren (siehe Abbildung 4.4).

Die Stimulation von humanen PBMC (3.3.2), welche in erster Linie Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen aber auch pDC beinhalten, erfolgte in einer Titration der Stimulationskonzentrationen über vier Stufen von 2 µM bis 0,031 µM. Während die TLR-Liganden RNA40 (TLR7-Ligand) und CpG2216 (TLR9-Ligand) als Positivkontrollen dienten, wurden unstimulierte Zellen und Dotap ohne komplexierte Nukleinsäuren als Negativkontrollen mitgeführt. Die Analyse der Zellüberstände im Zytokin- bzw. Interferon-ELISA erfolgte nach 20-stündiger Inkubation (3.2.5.1).



**Abbildung 4.4:** RNA/DNA-Hybride sind sowohl unter aziden Bedingungen als auch bei Temperaturen über 37 °C stabil. 5 µg mit SybrGold gefärbte RNA/DNA-Hybride wurden der Schmelzkurvenanalyse unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) und unter endosomal Bedingungen (pH 5,5) unterzogen. Repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten RNA/DNA-Hybride (Hybrid CMV27, Hybrid CMV63, Hybrid HIVPPT) in humanen PBMC zur Induktion einer antiviralen IFN $\alpha$ -vermittelten Immunreaktion führen. Die korrespondierende ssDNA der synthetischen RNA/DNA-Hybride führte zwar ebenfalls zur Sezernierung von IFN $\alpha$ , jedoch in geringerem Ausmaß. Bei den verwendeten niedrigeren Konzentrationen zeigte sich eine deutlich stärkere IFN $\alpha$ -Induktion durch RNA/DNA-Hybride im Vergleich zur Induktion durch ssDNA. Die korrespondierende ssRNA führte nicht zur Produktion von IFN $\alpha$  (Abbildung 4.5a). Diese Tatsachen zeigten zusätzlich, dass ssDNA- oder ssRNA-Kontaminationen innerhalb der Hybridpräparationen nicht für den beobachteten Stimulationseffekt verantwortlich sein konnten. Die Induktion einer proinflammatorischen, durch die Sekretion von IL-6 gekennzeichneten Immunantwort konnte nicht nachgewiesen werden. Abbildung 4.5b zeigt die IL-6 Produktion exemplarisch für die Stimulationskonzentration von 0,5  $\mu$ M. Lediglich ssRNA HIVPPT führte zur Ausschüttung von IL-6.



**Abbildung 4.5: Synthetische RNA/DNA-Hybride induzieren eine antivirale Immunantwort in humanen PBMC.** Humane PBMC wurden mit verschiedenen Nukleinsäurekonzentrationen ((a) 2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 0,125  $\mu$ M, 0,031  $\mu$ M; (b) 0,5  $\mu$ M) stimuliert. RNA/DNA-Hybride (schwarze Balken), ssRNA (weiße Balken) und ssDNA (dunkelgraue Balken) wurden mit Dotap komplexiert. 0,75  $\mu$ M mit Dotap komplexierte ssRNA40 und 1  $\mu$ M CpG2216 wurden als Positivkontrollen mitgeführt. Die Zytokinausschüttung wurde nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA analysiert. Repräsentativ für zwei unabhängige Spender.

### 4.1.2 TLR9 detektiert synthetische RNA/DNA-Hybride

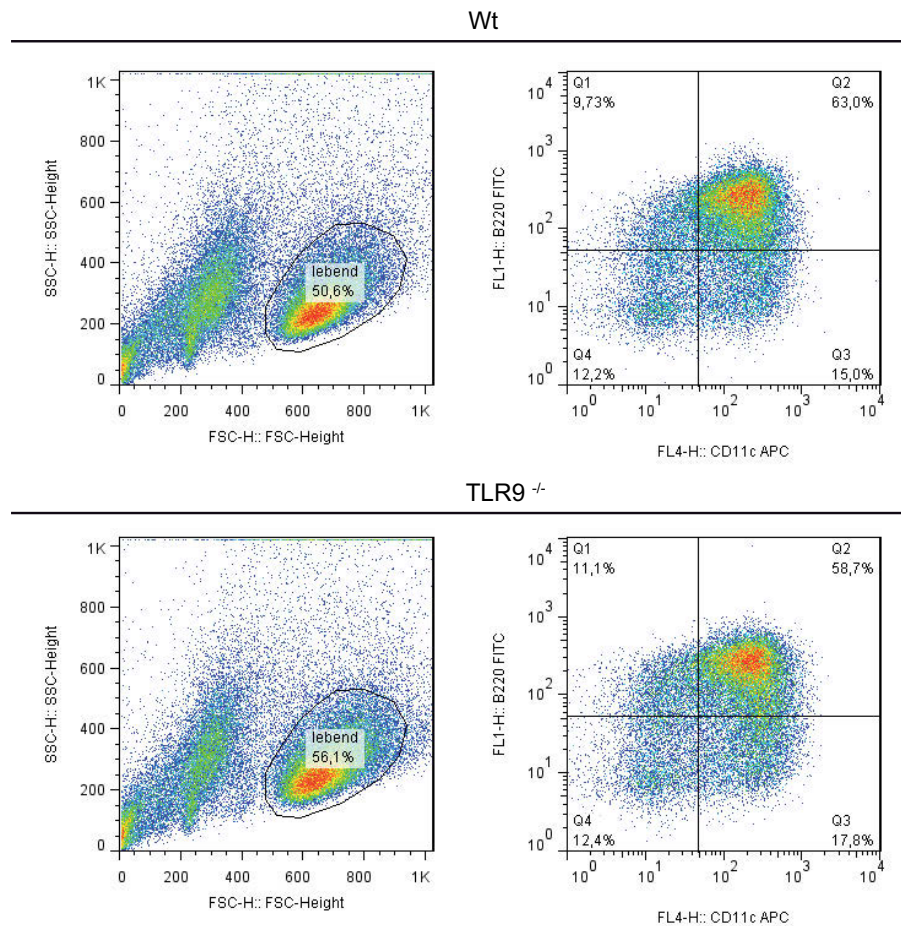
Im humanen System konnte gezeigt werden, dass die RNA/DNA-Hybride CMV27, CMV63 und HIVPPT eine primär durch die Sezernierung von  $\text{IFN}\alpha$  gekennzeichnete antivirale Immunantwort auslösen. Da plasmazytoide dendritische Zellen als Hauptproduzenten von  $\text{IFN}\alpha$  gelten, wurden im murinen System Flt3L-Kulturen, welche zu einem Großteil aus pDC bestehen, generiert. Aufgrund der Komplexierung der Stimuli mit dem kationischen Transfektionsreagenz Dotap, welches Nukleinsäuren in erster Linie in das endosomale Kompartiment transfiziert, lag es nahe, dass endosomal lokalisierte TLR für die Detektion von RNA/DNA-Hybriden in Betracht kamen. Es wurden Flt3L-DC aus TLR9-defizientem- und zur Kontrolle aus C57BL/6-Wildtyp-Knochenmark generiert und mit den entsprechenden Nukleinsäuren stimuliert. Des Weiteren erfolgte ein fluoreszenzmikroskopischer intrazellulärer Nachweis von intakten RNA/DNA-Hybriden und die spezifische Bindung von RNA/DNA-Hybriden an TLR9 wurde in einem ELISA-basierten System verifiziert.

Die Knochenmarkszellen der C57BL/6-Wildtyp und TLR9-defizienten Mäuse wurden nach achttägiger Flt3L-induzierter Differenzierung (3.3.4) durchflusszytometrisch auf die Expression der pDC-spezifischen Oberflächenmarker B220 und CD11c untersucht (3.4.1). Der Anteil der lebenden Zellen betrug zwischen 50 % und 60 %. Innerhalb der lebenden Zellen differenzierten ca. 60 % zu  $\text{B220}^+/\text{CD11c}^+$  pDC und etwa 16 % der Zellen zu  $\text{B220}^-/\text{CD11c}^+$  cDC (Abbildung 4.6).

Die Stimulation der Flt3L-DC erfolgte in einer Titration der Stimulationskonzentrationen über drei Stufen von  $2\text{ }\mu\text{M}$  bis  $0,125\text{ }\mu\text{M}$ . Die Analyse der Interferon- bzw. Zytokinspiegel erfolgte nach 20-stündiger Inkubation. Sowohl die Sequenzen als auch die Überprüfungen der Hybridisierungsreaktionen sind Abschnitt 4.1.1 zu entnehmen. Die TLR-Liganden RNA40 (TLR7-Ligand) und CpG2216 (TLR9-Ligand) dienten als Positivkontrollen bzw. Knockout-Status-Kontrollen der murinen Zellen. Unstimulierte Zellen und Dotap ohne komplexierte Nukleinsäuren wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

Wie auch im humanen System induzierten alle RNA/DNA-Hybride (Hybrid CMV27, Hybrid CMV63 und Hybrid HIVPPT) die Produktion von  $\text{IFN}\alpha$ . Die Erkennung der RNA/DNA-Hybride erfolgt durch TLR9, da TLR9-defiziente Flt3L-DC nicht mit einer Interferonausschüttung auf Stimulation mit RNA/DNA-Hybriden reagierten (Abbildung 4.7a). Auch für das murine System konnte eine  $\text{IFN}\alpha$ -Induktion durch die korrespondierenden ssDNA beobachtet werden. Die durch RNA/DNA-Hybride induzierten Interferonspiegel lagen jedoch auf einem deutlich höheren Niveau als diejenigen durch ssDNA induzierten. Einzelsträngige RNA hingegen führten



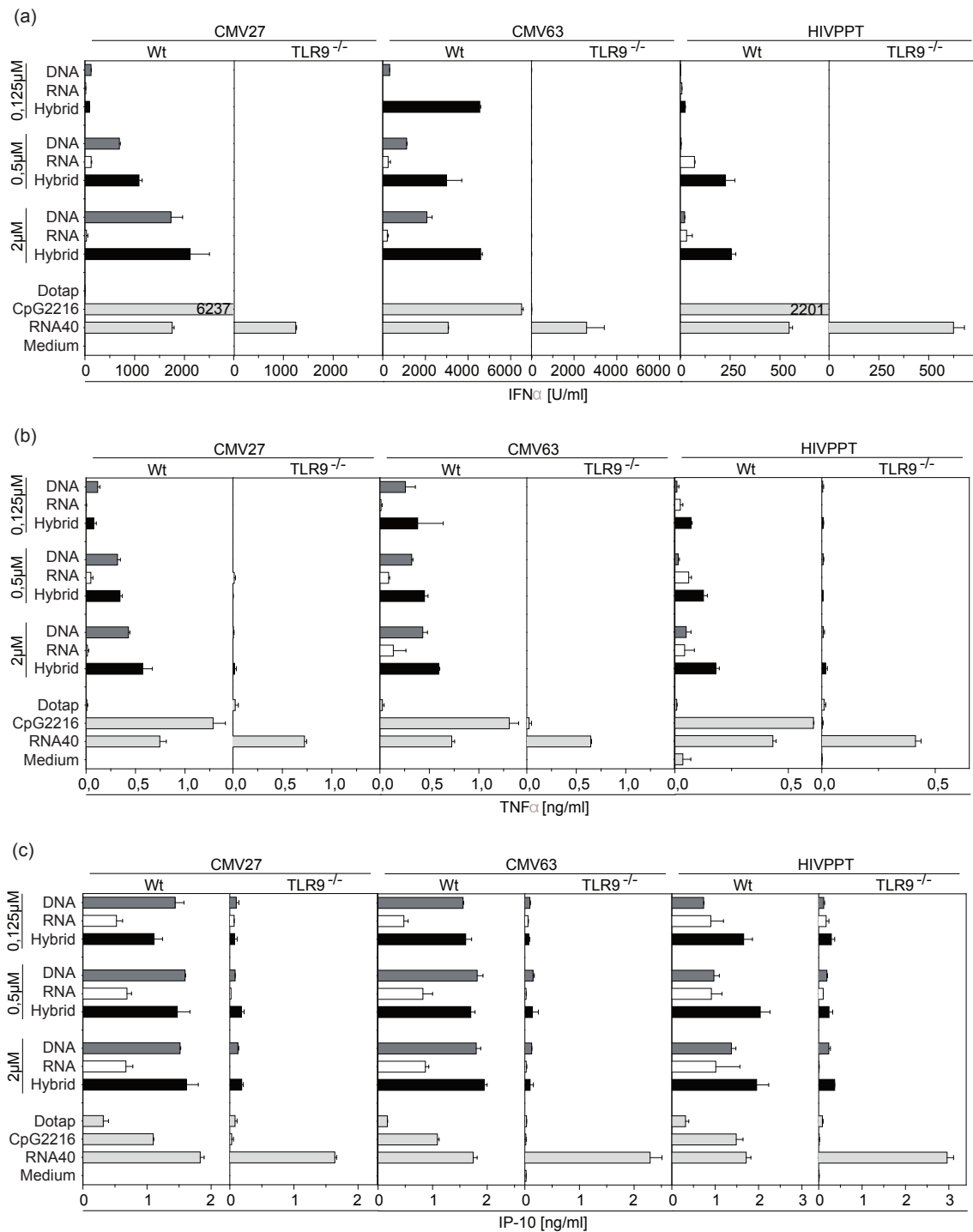


**Abbildung 4.6: Analyse des Differenzierungsstatus der Flt3L-DC.** Die Flt3L-induzierte Differenzierung der Wt- und TLR9-defizienten-Knochenmarkzellen wurde durchflusszytometrisch anhand der pDC-spezifischen Oberflächenmarker B220 und CD11c überprüft. Repräsentativ für fünf unabhängige Experimente.

auch im murinen System zu keiner IFN $\alpha$ -Ausschüttung.

Im murinen System war außerdem die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort durch RNA/DNA-Hybride zu beobachten. RNA/DNA-Hybride induzierten die Ausschüttung des Zytokins TNF $\alpha$  (Abbildung 4.7b). Die Einleitung der proinflammatorischen Immunreaktion erfolgte ebenfalls in Abhängigkeit von TLR9 und die korrespondierende ssDNA führte auch zur Ausschüttung von TNF $\alpha$ . Analog zur antiviralen IFN $\alpha$ -Induktion lagen die durch RNA/DNA-Hybride induzierten Zytokinspiegel über dem Niveau der durch ssDNA induzierten TNF $\alpha$ -Spiegel.

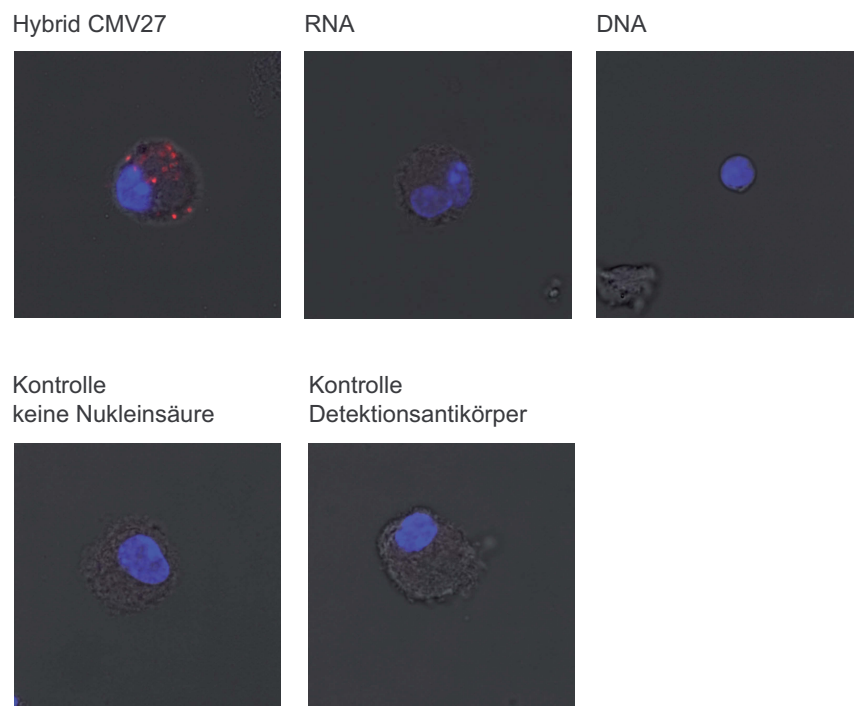




**Abbildung 4.7: RNA/DNA-Hybrid-induzierte Zytokinausschüttung in Abhängigkeit von TLR9.** Wt und TLR9-defiziente Flt3L-DC wurden mit verschiedenen Nukleinsäurekonzentrationen (2  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M und 0,125  $\mu$ M) stimuliert. RNA/DNA-Hybride (schwarze Balken), ssRNA (weiße Balken) und ssDNA (dunkelgraue Balken) wurden mit Dotap komplexiert. 0,75  $\mu$ M mit Dotap komplexierte ssRNA40 und 1  $\mu$ M CpG2216 wurden als Kontrollen mitgeführt. Die Analyse der Zytokin- bzw. Chemokinspiegel für IFN $\alpha$  (a), TNF $\alpha$  (b) und IP-10 (c) erfolgte nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Analyse des Chemokins IP-10 zeigte, dass sowohl RNA/DNA-Hybride als auch die korrespondierenden ssRNA und ssDNA dessen Ausschüttung bewirkten. RNA/DNA-Hybride induzierten im Vergleich zu ssDNA vergleichbare Mengen des Chemokins, ssRNA induzierte die geringsten Mengen IP-10 (siehe Abbildung 4.7c). Die Produktion von IP-10 erfolgte ebenfalls in Abhängigkeit von TLR9.

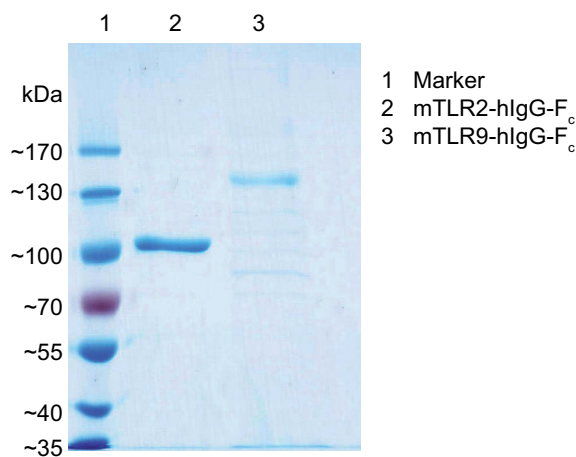
Um intakte RNA/DNA-Hybride in Flt3L-DC intrazellulär nachzuweisen, wurde das Hybrid CMV27 nach erfolgter Transfektion (3.3.5) mit dem RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörper S9.6 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (3.5). Nicht-transfizierte, ssRNA-transfizierte und ssDNA-transfizierte Zellen dienten der Kontrolle. Während die Kontrollzellen lediglich eine Kernfärbung zeigten, konnte das Hybrid CMV27 eindeutig als punktuelle Färbung, welche ein Hinweis auf endosomale Akkumulation darstellt, detektiert werden (siehe Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8: Intrazelluläre Detektion von synthetischen RNA/DNA-Hybriden.** Wt Flt3L-DC wurden mit RNA/DNA-Hybrid CMV27, entsprechender ssRNA und ssDNA mit Hilfe von Dotap in einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M transfiziert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden RNA/DNA-Hybride in den fixierten und permeabilisierten Zellen durch den anti-RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörper S9.6 und einem Alexa568-markierten Detektionsantikörper nachgewiesen (rot). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). Die Aufnahme der Immunfluoreszenzen erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Wie beschrieben, erfolgt die Detektion der RNA/DNA-Hybride durch TLR9. Die

direkte Bindung des Hybrids an die rekombinante extrazelluläre Domäne des murinen TLR9 wurde zusätzlich mit Hilfe eines ELISA-basierten Systems belegt (3.2.5.3). Die rekombinante extrazelluläre Domäne des murinen TLR2 fungierte als Kontrolle. Zunächst wurden TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine aus Zelllysaten stabil transfizierter Zellen über eine Protein A-Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt (3.2.1). Die Proteinkonzentrationen der aufgereinigten TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine wurden mittels BCA-Assay bestimmt und deren Reinheit anschließend mittels denaturierender SDS-PAGE analysiert (3.2.3). Für mTLR2 zeigte sich eine eindeutige Bande für eine Proteingröße von 100 kDa und für mTLR9 für eine Proteingröße von 150 kDa (siehe Abbildung 4.9) [Rutz et al. 2004].



**Abbildung 4.9: Analyse der säulenchromatographisch aufgereinigten TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine mittels denaturierender SDS-PAGE.** 5 µg der entsprechenden TLR-hIgG-Fc-Fusionsproteine wurden auf ein 7,5 % iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Coomassie-Lösung. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Da es sich jeweils um mit dem humanen IgG1-Fc fusionierte Proteine handelte, konnten die Fusionsproteine mittels Protein A an eine ELISA-Platte gebunden werden. Biotinylierte-Oligonukleotide wurden wiederum durch peroxidasegekoppeltes Streptavidin nachgewiesen. Um die Bindungsstärke des Hybrides an den Rezeptor zu verstärken, wurden RNA und DNA mit einer Länge von 43 Nukleotiden verwendet (Hybrid MuLV43). Es handelt sich um eine Sequenz aus dem *gag*-Gen des murinen Leukämievirus (Abbildung 4.10).

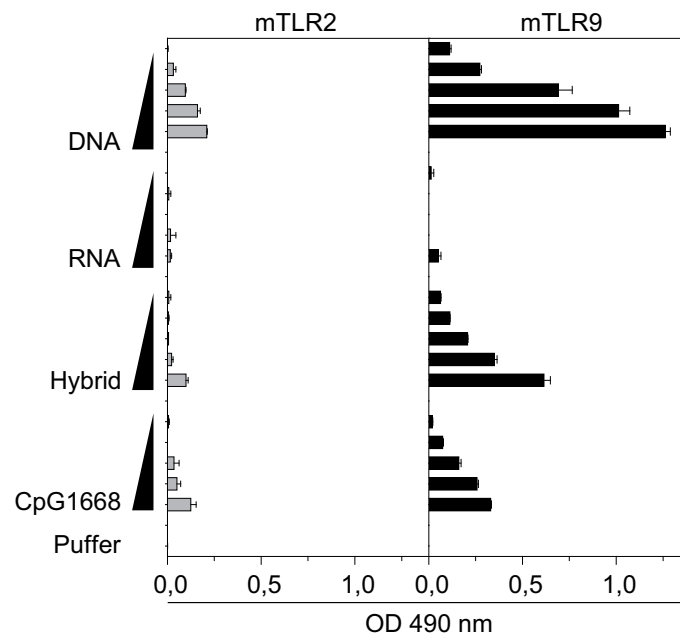
Eine konzentrationsabhängige Bindung des RNA/DNA-Hybrides MuLV43 an den murinen TLR9 konnte mit Hilfe dieses Systems nachgewiesen werden. Wie zu

Hybrid MuLV43

5' CUGCAUUGAUUGAAUCUGUCCUCACCCACCCAGCCCACCUG 3'  
 3' CAGGTGGGCTGGTGGGTGGTGAGGACAGATTCAATCAATGCAG 5'

**Abbildung 4.10: Sequenz des RNA/DNA-Hybrids MuLV43 mit zugehörigen komplementären ssRNA (schwarz) und ssDNA (blau).** Das RNA/DNA-Hybrid MuLV43 stammt aus dem *gag*-Gen des murinen Leukämievirus.

erwarten, bindet ssRNA nicht an TLR9, ssDNA hingegen zeigt eine starke Bindung (Abbildung 4.11). Weder ssRNA, ssDNA noch das Hybrid zeigten eine deutliche Interaktion mit dem murinen TLR2. Diese Beobachtung stärkt noch einmal die Spezifität der Interaktion von ssDNA und RNA/DNA-Hybriden mit TLR9.



**Abbildung 4.11: RNA/DNA-Hybride binden spezifisch an die extrazelluläre Domäne von mTLR9.** Immobilisierte mTLR2- und mTLR9-Fusionsproteine wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,5  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,02  $\mu$ M, 0,004  $\mu$ M und 0,0008  $\mu$ M) von 3'-biotinylierten Nukleinsäuren (RNA/DNA-Hybrid, ssRNA, ssDNA) inkubiert. An TLR gebundene Nukleinsäuren wurden mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates visualisiert. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### **4.1.3 RNA/DNA-Hybride des HCMV-Genoms sind für die Induktion einer Immunreaktion nicht ausschließlich verantwortlich**

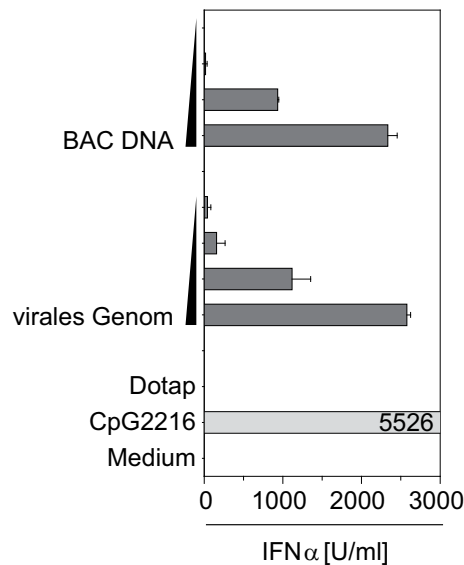
Um das immunstimulatorischen Potential von RNA/DNA-Hybriden weitergehend zu analysieren, wurde im Folgenden das virale HCMV-Genom untersucht. Wie bereits beschrieben, besitzt das HCMV-Genom äußerst stabile RNA/DNA-Hybridstrukturen innerhalb des oriLyt [Anders et al. 1992; Prichard et al. 1998]. Wildtyp Flt3L-DC wurden mit viralem HCMV-Genom und BAC (bacterial artificial chromosome) DNA, welche das virale HCMV-Genom ohne RNA/DNA-Hybridstrukturen enthält, im Komplex mit Dotap stimuliert. Sowohl das virale HCMV-Genom als auch die BAC DNA wurden von Prof. Dr. med. Hartmut Hengel, Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt. Die Titration der Konzentrationen erfolgte über vier Stufen (10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,08 µg/ml) und die IFN $\alpha$ -Ausschüttung wurde nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA bestimmt.

Es konnte kein Unterschied im immunstimulatorischen Potential von viralem HCMV-Genom im Vergleich zu BAC DNA nachgewiesen werden (Abbildung 4.12). RNA/DNA-Hybridstrukturen innerhalb des HCMV-Genoms sind daher nicht ausschließlich für die Einleitung einer Immunreaktion verantwortlich.

### **4.1.4 RNA/DNA-Hybride des Mitochondrien-Genoms sind für die Induktion einer Immunantwort nicht essentiell**

Bisher konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass RNA/DNA-Hybride eine Immunantwort über TLR9 induzieren. Im mitochondrialen Genom (mtGenom) wurde in der Literatur ein stabiles RNA/DNA-Hybrid (R-Loop) am Ursprung der Leitstrang-DNA-Replikation beschrieben. Des Weiteren wurde mtDNA als endogener Ligand für TLR9 identifiziert [Clayton 2000; Oka et al. 2012].

Unter Verwendung eines ELISA-basierten Systems (3.2.5.2) wurden mit Hilfe des anti-RNA/DNA-Hybrid-Antikörpers S9.6 RNA/DNA-Hybride innerhalb des mitochondrialen Genoms nachgewiesen. Verschiedene Konzentrationen des mtGenoms (5 µg/ml, 1,25 µg/ml und 0,3125 µg/ml) wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert und über den S9.6 Antikörper, sowie einen peroxidasegekoppelten Detektionsantikörper, konnten RNA/DNA-Hybride visualisiert werden. Der erfolgreiche RNase H-Verdau (2,5 U/10 µg Nukleinsäure) konnte ebenfalls über dieses System nachgewiesen werden und es konnte verifiziert werden, dass LR PCR-Produkte tatsächlich keine RNA/DNA-Hybride enthielten. Ein synthetisches RNA/DNA-Hybrid



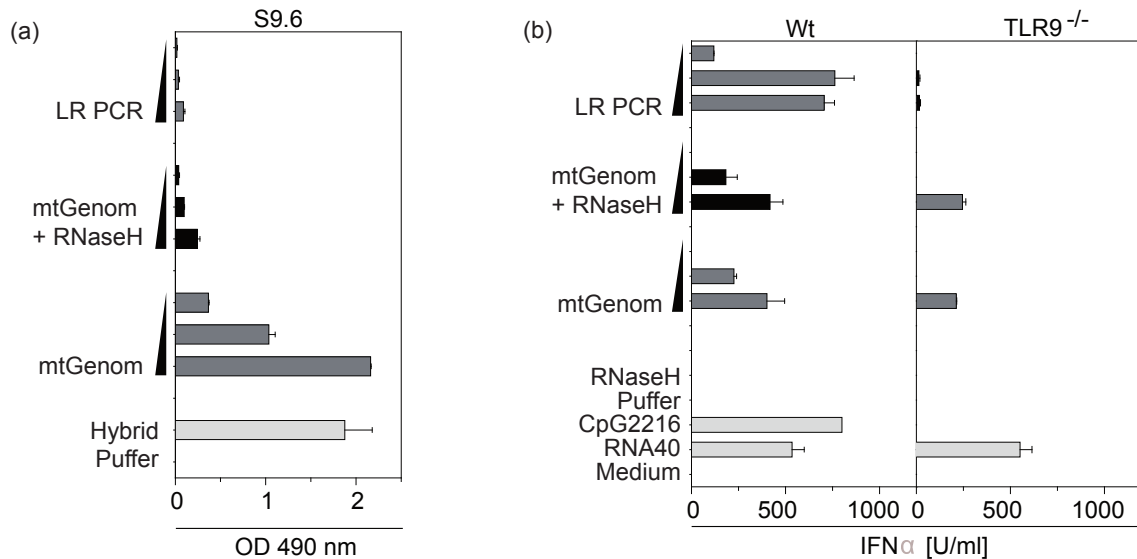
**Abbildung 4.12: RNA/DNA-Hybride innerhalb des HCMV-Genoms sind für die Induktion einer Immunantwort nicht ausschließlich verantwortlich.** Wt Flt3L-DC wurden mit HCMV-Genomen und BAC DNA in verschiedenen Konzentrationen (10 µg/ml, 2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,08 µg/ml) mit Dotap komplexiert stimuliert. 1 µM CpG2216 wurde als Positivkontrollen mitgeführt. IFNα-Spiegel in den Zellüberständen wurden nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA bestimmt.

wurde als Positivkontrolle mitgeführt (siehe Abbildung 4.13a).

Um den Einfluss mitochondrialer RNA/DNA-Hybride auf den immunstimulatorischen Effekt des mtGenoms zu analysieren, wurden C57BL/6-Wildtyp und TLR9-defiziente Flt3L-DC mit aufgereinigten mtGenomen (3.1.3) stimuliert. Die Titration der Stimulationskonzentrationen erfolgte von 10 µg/ml über drei Stufen bis auf 0,4 µg/ml. Die Stimuli wurden mit Dotap komplexiert und die IFNα-Ausschüttung in den Zellüberständen nach 20-stündiger Inkubationsdauer mittels ELISA analysiert. Zur direkten Analyse des Einflusses der R-Loop-Bereiche der mtGenome erfolgte ein RNase H-Verdau, um den RNA-Anteil des RNA/DNA-Hybridbereiches abzubauen. Long Range (LR) PCR-Produkte (3.1.1), welche Amplifikate des gesamten mtGenoms darstellten und keine RNA/DNA-Hybridbereiche enthielten, wurden zur Kontrolle mitgeführt.

Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass RNA/DNA-Hybridstrukturen innerhalb des R-Loops für die TLR9-abhängige Detektion der mitochondrialen Genome verantwortlich sind (Abbildung 4.13b). Unverdaute und RNase H-verdaute mtGenome induzierten nahezu identische IFNα-Spiegel. Eine zumindest teilweise TLR9-abhängige Detektion der mtGenome konnte nachgewiesen werden. Unverdaute und RNase H-verdaute mtGenome zeigten jedoch für die Konzentration von 10 µg/ml auch in TLR9-defizienten Zellen eine reduzierte aber dennoch deutliche

IFN $\alpha$ -Ausschüttung. Die Detektion der LR PCR-Produkte erfolgte hingegen ausschließlich in Abhängigkeit von TLR9.

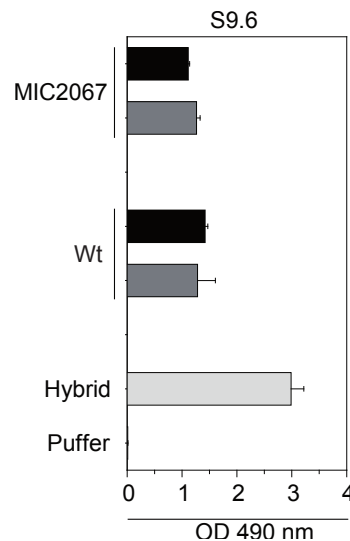


**Abbildung 4.13: RNA/DNA-Hybrid-Strukturen innerhalb des mtGenoms sind für die TLR9-abhängige Detektion nicht essentiell.** (a) LR PCR-Produkte und mtGenome wurden mit Hilfe des anti-RNA/DNA-Hybrid Antikörpers S9.6 auf vorhandene RNA/DNA-Hybride untersucht und der RNase H-Verdau überprüft. Hybrid MuLV43 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. (b) Wt und TLR9-defiziente Flt3L-DC wurden mit mtGenomen (unverdaut bzw. RNase H-verdaut) und LR PCR-Produkten in verschiedenen Konzentrationen (10  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml und 0,4  $\mu$ g/ml) mit Dotap komplexiert stimuliert. 0,75  $\mu$ M mit Dotap komplexierte ssRNA40 und 1  $\mu$ M CpG2216 wurden als Kontrollen mitgeführt. IFN $\alpha$ -Spiegel in den Zellüberständen wurden nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA bestimmt. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

#### 4.1.5 Nukleinsäuren des RNase H-defiziente *E.coli*-Stamms MIC2067 zeigen im Vergleich zum Wildtyp-Stamm kein verändertes Stimulationspotential in Flt3L-DC

Zur vergleichenden Analyse des Stimulationspotentials des RNase HI- und RNase HII-defizienten *E.coli*-Stammes MIC2067 [Itaya et al. 1999] mit dem Wildtyp-Stamm erfolgte die Kultivierung der *E.coli*-Stämme mit anschließender Aufreinigung der Genome (3.1.2). Da die RNase H für den Abbau des RNA-Stranges innerhalb eines RNA/DNA-Hybrides verantwortlich ist, lag die Vermutung nahe, dass für dieses Enzym defiziente Bakterien einen wesentlich höheren Anteil an RNA/DNA-Hybriden in ihrem Genom aufweisen und dadurch ein stärkeres immunstimulatorisches Potential für TLR9 besitzen.

Die Genomaufreinigung erfolgte während der stationären bzw. der exponentiellen Wachstumsphase der *E.coli*-Stämme. Während der exponentiellen Wachstumsphase liegt die maximale Teilungsrate der Bakterien vor, welche mit einer starken Genomreplikation einhergeht und deshalb von erhöhtem RNA/DNA-Hybrid-Gehalt im Vergleich zur stationären Wachstumsphase gekennzeichnet sein sollte.



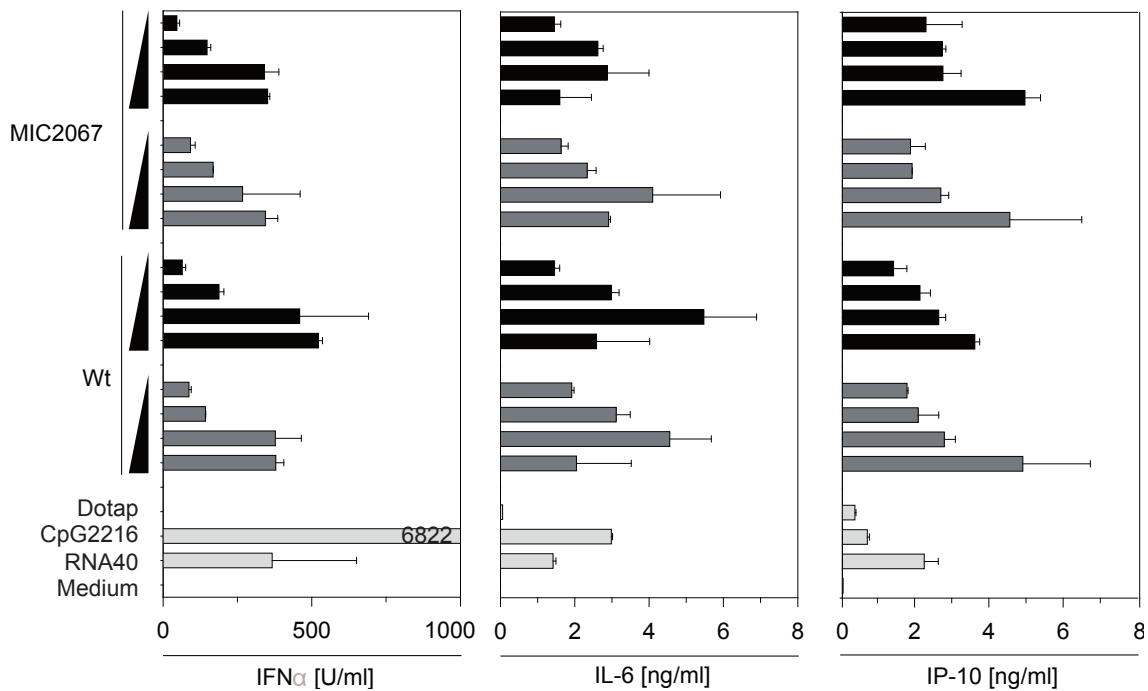
**Abbildung 4.14: Nachweis von RNA/DNA-Hybriden in aufgereinigten Genomen von Wt *E.coli* und MIC2067 *E.coli*.** *E.coli*-Genome wurden während der stationären Wachstumsphase (dunkelgraue Balken) und während der exponentiellen Wachstumsphase (schwarze Balken) unter Verwendung des anti-RNA/DNA-Hybrid Antikörpers S9.6 auf vorhandene RNA/DNA-Hybride überprüft. 30 µg/ml der Genome wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert, RNA/DNA-Hybride über den S9.6 Antikörper detektiert und über einen peroxidasekonjugierten Antikörper visualisiert. Hybrid MuLV43 wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die bakteriellen Genome wurden mit Hilfe des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 in einem ELISA-basierten System auf vorhandene RNA/DNA-Hybride analysiert (3.2.5.2) und Flt3L-DC wurden mit einer Titration der Konzentrationen über vier Stufen (25 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml und 0,2 µg/ml) im Komplex mit Dotap stimuliert. Zytokin- bzw. Chemokinspiegel für IFN $\alpha$ , IL-6 und IP-10 in den Zellüberständen wurden nach 20-stündiger Inkubationsdauer mittels ELISA analysiert.

Die Hypothese im Bezug auf den RNA/DNA-Hybrid-Gehalt der bakteriellen Genome konnte nicht verifiziert werden (Abbildung 4.14). Es zeigten sich weder Unterschiede für die Analyse der beiden unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, noch für die verschiedenen *E.coli*-Stämme. Die Immobilisierung von 10 µg/ml der *E.coli*-



Genome zeigte ebenfalls keine Unterschiede im RNA/DNA-Hybrid-Gehalt (Daten nicht gezeigt). Auch das konzentrationsabhängige immunstimulatorische Potential war für alle getesteten Bedingungen nahezu identisch. Die Spiegel für IFN $\alpha$ , IL-6 und IP-10 lagen für identische Stimulationskonzentrationen auf einem einheitlichen Niveau (Abbildung 4.15).



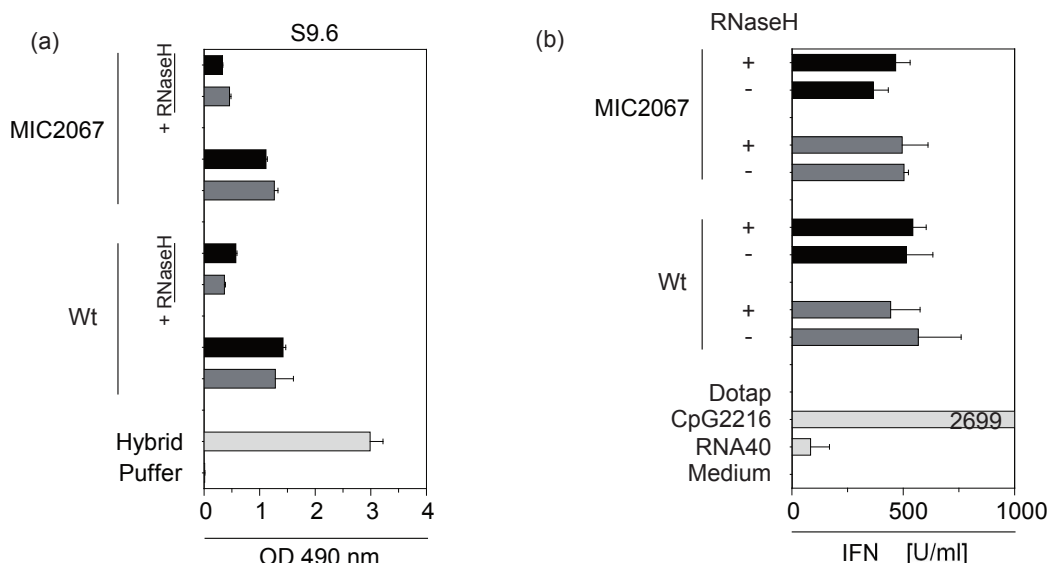
**Abbildung 4.15: Analyse des immunstimulatorischen Potentials aufgereinigter *E.coli*-Genome.** Flt3L-DC wurden mit *E.coli*-Genomen (Wt und MIC2067) aus der stationären Wachstumsphase (dunkelgraue Balken) und der exponentiellen Wachstumsphase (schwarze Balken) im Komplex mit Dotap stimuliert. Die Titration der Stimulationskonzentrationen erfolgte über vier Stufen (25 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml und 0,2 µg/ml) und die Zytokin- bzw. Chemokinspiegel wurden nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA bestimmt. 0,75 µM mit Dotap komplexierte ssRNA40 und 1 µM CpG2216 wurden als Kontrollen mitgeführt. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

In einem weiteren Experiment wurden die Genome der beiden *E.coli*-Stämme mit RNase H (2,5 U/10 µg Nukleinsäure) verdaut. Somit konnte eine weitere Analyse des immunstimulatorischen Potentials der RNA/DNA-Hybride innerhalb der *E.coli*-Genome vorgenommen werden.

Die bakteriellen Genome wurden mit Hilfe des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 in einem ELISA-basierten System auf vorhandene RNA/DNA-Hybride analysiert (3.2.5.2) und der RNase H-Verdau der Genome kontrolliert (Abbildung 4.16a). Flt3L-DC wurden sowohl mit unverdauten als auch mit RNase H-

verdauten *E.coli*-Genomen aus der stationären und der exponentiellen Wachstumsphase im Komplex mit Dotap stimuliert. Die IFN $\alpha$ -Spiegel wurden nach 20-stündiger Inkubationsdauer mittels ELISA analysiert.

Obwohl durch den RNase H-Verdau der *E.coli*-Genome eine deutliche Reduktion des RNA/DNA-Hybrid-Anteils erzielt wurde (Abbildung 4.16a), zeigten sich durch den RNase H-Verdau keine Veränderungen im immunstimulatorischen Potential der verschiedenen Genome. Abbildung 4.16b zeigt die IFN $\alpha$ -Sekernierung exemplarisch für die Stimulation von Flt3L-DC mit 5  $\mu$ g/ml der entsprechenden Nukleinsäuren.

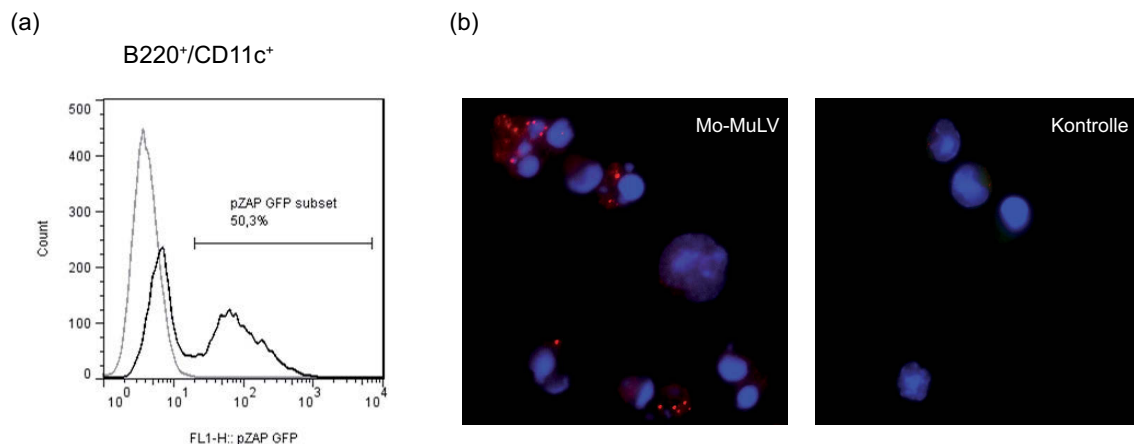


**Abbildung 4.16: Analyse des immunstimulatorischen Potentials RNase H-verdauter *E.coli*-Genome.** (a) *E.coli*-Genome aus der stationären Wachstumsphase (dunkelgraue Balken) und der exponentiellen Wachstumsphase (schwarze Balken) wurden mit Hilfe des anti-RNA/DNA-Hybrid Antikörpers S9.6 auf vorhandene RNA/DNA-Hybride untersucht und der RNase H-Verdau (2,5 U/10  $\mu$ g Nukleinsäure) überprüft. 30  $\mu$ g/ml der Genome wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert, RNA/DNA-Hybride über den S9.6 Antikörper detektiert und über einen peroxidasekonjugierten Antikörper visualisiert. (b) Flt3L-DC wurden mit 5  $\mu$ g/ml *E.coli*-Genomen (Wt und MIC2067) aus der stationären Wachstumsphase (dunkelgraue Balken) und der exponentiellen Wachstumsphase (schwarze Balken) im Komplex mit Dotap stimuliert. Der RNase H-Verdau der Genome erfolgte wie unter (a) beschrieben. 0,75  $\mu$ M mit Dotap komplexierte ssRNA40 und 1  $\mu$ M CpG2216 wurden als Kontrollen mitgeführt. Nach 20-stündiger Inkubation erfolgte die Analyse der IFN $\alpha$ -Sekernierung mittels ELISA.

### 4.1.6 RNA/DNA-Hybride sind in retrovirusinfizierten Flt3L-DC nachweisbar

Um die physiologische Relevanz der Detektion von RNA/DNA-Hybriden über TLR9 zu bekräftigen, wurde die Bildung von RNA/DNA-Hybriden im Verlauf einer retroviralen Infektion analysiert. Wie unter 1.3.1 beschrieben, kommt es während der retroviralen Infektion im Verlauf der Reversen Transkription zur Ausbildung von RNA/DNA-Hybriden. Flt3L-DC wurden am fünften Tag der Differenzierung mit GFP-markiertem Moloney MuLV (Mo-MuLV) [Erlwein et al. 2003] infiziert (3.3.6). Am achten Differenzierungstag erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen (3.4.1). Innerhalb der B220<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> pDC zeigte sich eine deutliche retrovirale Infektion von ca. 50 % der Zellen (siehe Abbildung 4.17a).

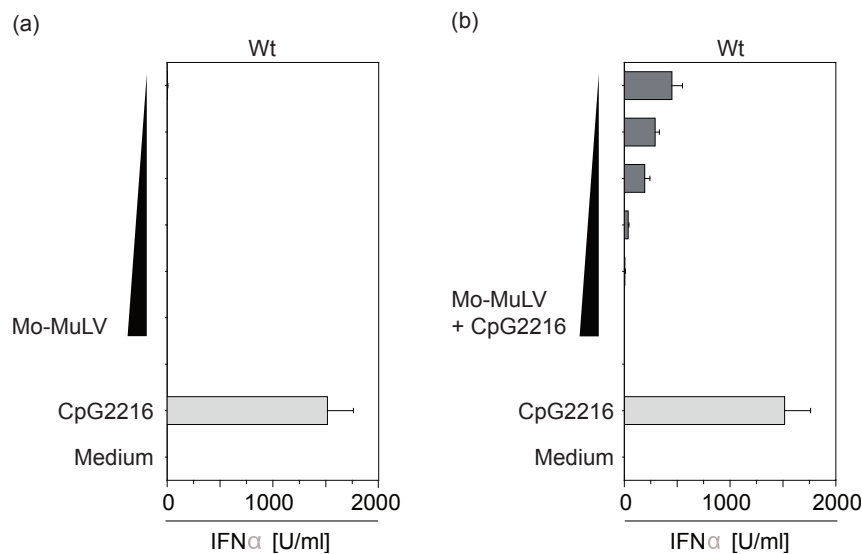
Von besonderer Bedeutung ist die fluoreszenzmikroskopische Analyse der infizierten Zellen. Unter Verwendung des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 (3.5), wurde die Bildung und die Akkumulation von RNA/DNA-Hybriden während der retroviralen Infektion sowohl als punktuelle als auch als zytoplasmatische Färbung der Hybride eindeutig nachgewiesen (Abbildung 4.17b).



**Abbildung 4.17: Intrazelluläre Detektion von RNA/DNA-Hybriden in Mo-MuLV infizierten Flt3L-DC.** Wt Flt3L-DC wurden an Tag 5 der Differenzierung mit 17,5 MOI GFP-markiertem Mo-MuLV infiziert. (a) Die retrovirale Infektion von B220<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> pDC wurde an Tag 8 der Differenzierung durchflusszytometrisch nachgewiesen. (b) RNA/DNA-Hybride wurden in Mo-MuLV infizierten, fixierten und permeabilisierten Flt3L-DC mit Hilfe des anti-RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 und einem Alexa568-markierten Detektionsantikörper nachgewiesen (rot). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau).

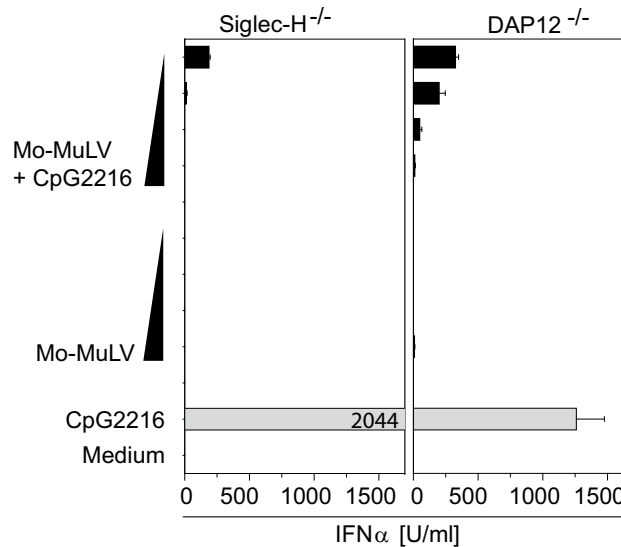
### 4.1.7 Mo-MuLV inhibiert die CpG2216-induzierte Sezernierung von IFN $\alpha$

Der Einfluss von RNA/DNA-Hybriden, welche während der retroviralen Infektion entstehen, sollte näher charakterisiert werden. Es zeigte sich jedoch, dass eine IFN $\alpha$ -Produktion durch Flt3L-DC in Folge der retroviralen Mo-MuLV Infektion ausblieb (Abbildung 4.18). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde anschließend analysiert, ob Mo-MuLV einen Einfluss auf die durch den TLR9-Liganden CpG2216-induzierte IFN $\alpha$ -Ausschüttung besitzt. Der TLR9-Ligand CpG2216 induzierte erwartungsgemäß hohe IFN $\alpha$ -Spiegel in Flt3L-DC (Abbildung 4.18). Um den Einfluss der Retroviren auf die IFN $\alpha$ -Induktion, ausgelöst durch CpG2216, näher zu analysieren, wurden Flt3L-DC mit verschiedenen Konzentrationen von 17,5 MOI über sechs Stufen bis 0,55 MOI Mo-MuLV für 30 Minuten inkubiert, bevor die Stimulation mit 0,0625  $\mu$ M CpG2216 erfolgte. Sowohl unstimulierte als auch mit 0,0625  $\mu$ M CpG2216 stimulierte Zellen dienten der Kontrolle. Nach 20-stündiger Inkubation erfolgte die Analyse des IFN $\alpha$ -Spiegels mittels ELISA.



**Abbildung 4.18: Mo-MuLV induziert keine antivirale Immunantwort in Flt3L-DC und inhibiert die CpG2216-vermittelte IFN $\alpha$ -Produktion.** (a) Wt Flt3L-DC wurden mit verschiedenen Konzentrationen Mo-MuLV inkubiert. Die Titration der Konzentrationen erfolgte über sechs Stufen (17,5 MOI bis 0,55 MOI). Die IFN $\alpha$ -Ausschüttung wurde nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA analysiert. (b) Wt Flt3L-DC wurden mit Mo-MuLV wie unter (a) beschrieben, für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit 0,0625  $\mu$ M CpG2216 stimuliert. Zur Kontrolle wurden die Flt3L-DC ohne retrovirale Vorinkubation mit 0,0625  $\mu$ M CpG2216 stimuliert (a und b). Die IFN $\alpha$ -Ausschüttung wurde nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA analysiert. Repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Abbildung 4.18b zeigt deutlich, dass eine Vorinkubation der Wt Flt3L-DC mit Mo-MuLV zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der CpG2216-induzierten IFN $\alpha$ -Sekretion führte.



**Abbildung 4.19: Mo-MuLV inhibiert die CpG2216-vermittelte IFN $\alpha$ -Produktion in Siglec-H- und DAP12-defizienten Flt3L-DC.** Siglec-H- bzw. DAP12-defiziente Flt3L-DC wurden mit verschiedenen Konzentrationen Mo-MuLV für 30 Minuten vorinkubiert. Die Titration der Konzentrationen erfolgte über vier Stufen von 17,5 MOI bis 2,19 MOI. Anschließend wurden die Zellen mit 0,0625  $\mu$ M CpG2216 stimuliert. Zur Kontrolle wurde 0,0625  $\mu$ M CpG2216 mitgeführt. Die IFN $\alpha$ -Ausschüttung wurde nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA analysiert.

Um den Mechanismus, welcher zur Inhibition der IFN $\alpha$ -Ausschüttung führt, zu untersuchen, wurden nachfolgend Siglec-H-defiziente und DAP12-defiziente Flt3L-DC differenziert. Der murine Oberflächenrezeptor Siglec-H induziert Signalwege über das Adaptermolekül DAP12. Es wurde bereits beschrieben, dass Antikörper gegen Siglec-H die TLR9-vermittelte Induktion von Typ I Interferonen inhibieren. Des Weiteren exprimieren DAP12-defiziente Mäuse keine Siglec-H Oberflächenrezeptoren und sezernieren nach Stimulation mit CpG DNA deutlich mehr IFN als Wildtyp pDC [Blasius et al. 2006; Pillai et al. 2012]. Diese Oberflächenrezeptoren bzw. Adaptermoleküle können also einen inhibitorischen Einfluss auf den IFN-Signalweg ausüben. Greift Mo-MuLV über diese Wege in den IFN-Signalweg ein, kann die Verwendung von für diesen Rezeptor bzw. dieses Adaptermolekül defizienten Zellen Hinweise auf den Inhibitionsmechanismus, welcher eine virale Evasionsstrategie darstellt, liefern.

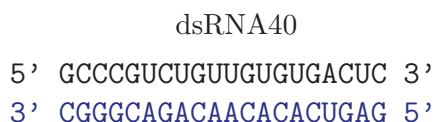
Siglec-H-defiziente bzw. DAP12-defiziente Flt3L-DC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von 17,5 MOI über vier Stufen bis 2,19 MOI Mo-MuLV für 30 Minuten inkubiert, bevor die Stimulation mit 0,0625  $\mu$ M CpG2216 erfolgte. Nach 20-stündiger Inkubation erfolgte die Analyse der IFN $\alpha$ -Spiegel mittels ELISA.

Mo-MuLV greift weder über den Oberflächenrezeptor Siglec-H noch über das Adaptermolekül DAP12 hemmend in den IFN $\alpha$ -Signalweg ein (Abbildung 4.19). Wie bereits für C57BL/6-Wildtyp Flt3L-DC gezeigt (Abbildung 4.18), führte die Vorinkubation der Siglec-H- und DAP12-defizienten Flt3L-DC mit Mo-MuLV zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der durch CpG2216 induzierten IFN $\alpha$ -Ausschüttung.

## 4.2 Das Potential cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans

Der zweite Teil dieser Dissertation befasst sich mit dem Potential von cholesterolkonjugierter synthetischer immunstimulatorischer RNA als Adjuvans. RNA40 wurde bereits als Ligand für TLR7 beschrieben (die Sequenz ist Abbildung 4.20 zu entnehmen) [Heil et al. 2004]. Es handelt sich bei RNA40 um eine guanosin- und uridinreiche RNA aus der U5 Region des HIV-1. Zur Einleitung einer Immunstimulation ist bisher die Komplexierung von RNA40 mit einem kationischen Transfektionsreagenz wie z. B. Dotap nötig. Die Verwendung eines solchen Zwei-Komponentensystems als Adjuvans ist für die Anwendung am Menschen problematisch, da Transfektionsreagenzien zelltoxisch wirken, was zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann.

Für die folgenden Experimente wurde synthetische cholesterolgekoppelte RNA40 verwendet. Cholesterol kommt natürlicherweise im menschlichen Körper vor und ist Bestandteil der Plasmamembranen, deren Stabilität durch Cholesteroleinlagerungen erhöht wird. Die Verwendung eines Ein-Komponentensystems, das auf körpereigenes Cholesterol als Träger für den TLR7-Liganden RNA40 zurückgreift, ist im Bezug auf die Verträglichkeit als Adjuvans wesentlich unbedenklicher als synthetische Transfektionsreagenzien.



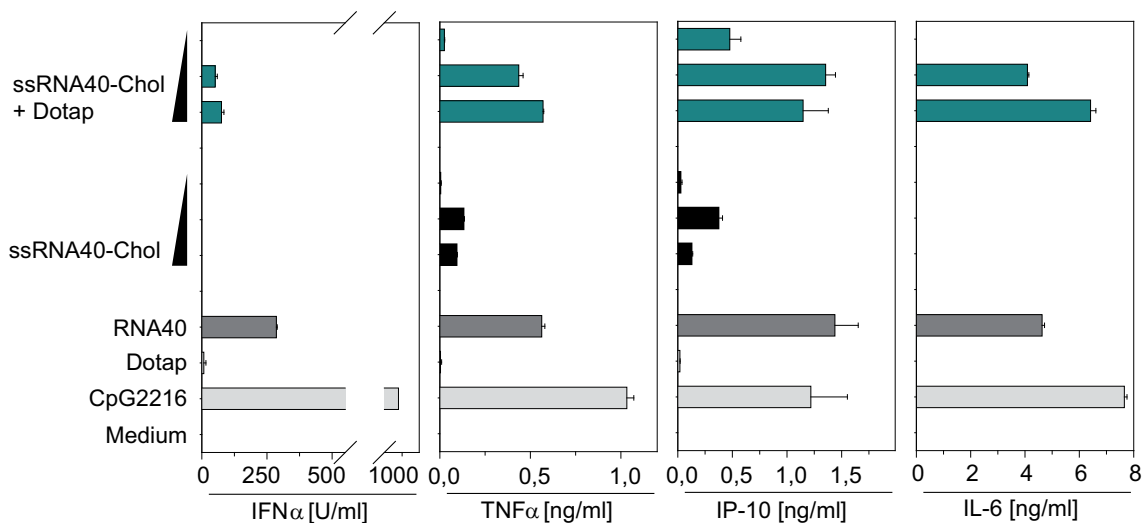
**Abbildung 4.20: RNA40-Sequenz.** ssRNA40 sense (schwarz) mit zugehörigem ssRNA40 antisense (blau) Strang. RNA40 ist eine guanosin- und uridinreiche RNA aus der U5 Region des HIV-1. Die Cholesterolkopplung befand sich am 3'-Ende des ssRNA40 sense Stranges und die Alexa488-Markierung am 3'-Ende des ssRNA40 antisense Stranges.

### 4.2.1 Cholesterolkonjugierte einzelsträngige RNA40 induziert keine antivirale Immunantwort

Zunächst erfolgte die Analyse des immunstimulatorischen Potentials von cholesterolkonjugierter einzelsträngiger RNA40 (ssRNA40-Chol). Wildtyp Flt3L-DC wurden mit 2,5 µM, 0,5 µM und 0,1 µM ssRNA40-Chol stimuliert (3.3.7). Zum Vergleich wurde ssRNA40-Chol mit Dotap komplexiert und dotapkomplexierte ssRNA40 ohne Cholesterolkopplung mitgeführt. Zusätzlich diente CpG2216 als Kontrolle. Unbe-

handelte Zellen und Dotap ohne komplexierte Nukleinsäure dienten als Negativkontrollen. Die Analyse der Zytokin- bzw. Chemokinspiegel erfolgte nach 20-stündiger Inkubationsdauer mittels ELISA.

Einzelsträngige RNA40-Chol induzierte weder die Produktion von IFN $\alpha$  noch die Sezernierung von IL-6 (Abbildung 4.21). Für TNF $\alpha$  und IP-10 konnte hingegen eine moderate Induktion beobachtet werden, wodurch ein erster Hinweis auf den immunstimulatorischen Effekt, welcher durch cholesterolgekoppelte ssRNA40 induziert wurde, gegeben war. Die Komplexierung von ssRNA40-Chol mit Dotap führte zu einer moderaten Induktion der IFN $\alpha$ -Sezernierung sowie zu einer deutliche Ausschüttung von TNF $\alpha$ , IP-10 und IL-6. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass ssRNA40-Chol entweder nicht in adäquater Menge von den Flt3L-DC aufgenommen wird oder keine ausreichende Stabilität gegenüber dem intrazellulären Abbau durch RNasen besitzt. Die Induktion der Immunreaktion von dotapkomplexierter ssRNA40-Chol ist deutlich effizienter, da die Komplexierung einen Schutz vor der Degradation durch RNasen gewährleistet.



**Abbildung 4.21: Cholesterolkonjugierte ssRNA40 löst keine antivirale Immunantwort aus.** Wt Flt3L-DC wurden mit ssRNA40-Chol im Komplex mit Dotap (dunkelgrüne Balken) oder ohne Komplexierung (schwarze Balken) mit verschiedenen Konzentrationen (2,5  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M) stimuliert. 1  $\mu$ M CpG2216 und 0,75  $\mu$ M mit Dotap komplexierte ssRNA40 wurden zur Kontrolle mitgeführt. Nach 20-stündiger Inkubationsdauer erfolgte die Analyse der Zytokin- bzw. Chemokinspiegel mittels ELISA.

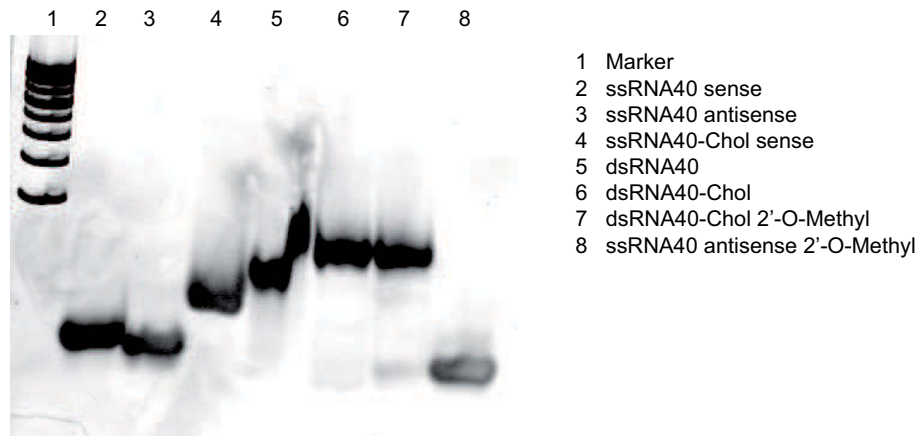


## 4.2.2 Cholesterolkonjugierte doppelsträngige RNA40 induziert eine Immunantwort in Flt3L-DC und wird von TLR7 detektiert

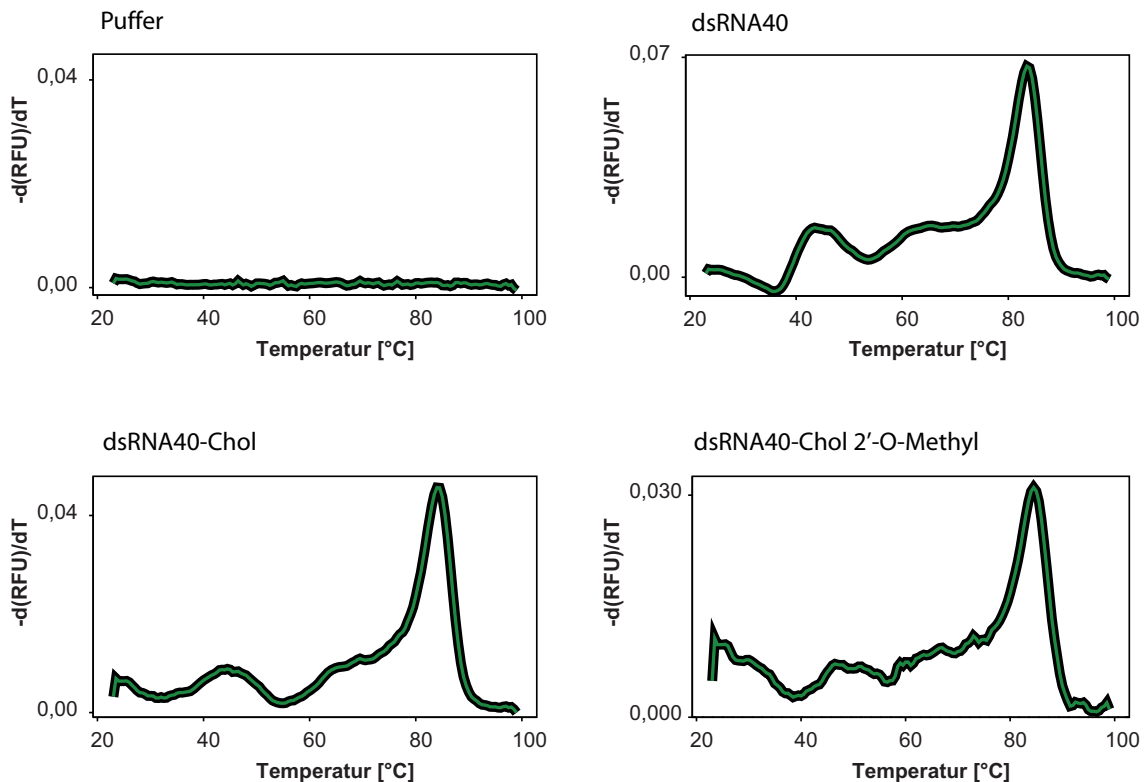
Aufgrund der Vermutung, dass ssRNA40-Chol nicht in adäquater Menge von den Flt3L-DC aufgenommen wurde oder keine ausreichende Stabilität aufweist, um eine deutliche Immunreaktion in Flt3L-DC auszulösen, wurde für die nachfolgenden Experimente doppelsträngige cholesterolgekoppelte RNA40 (dsRNA40-Chol) verwendet. Doppelsträngige RNA-Moleküle sind im Vergleich zu einzelsträngigen RNA-Molekülen wesentlich stabiler. Des Weiteren wurde die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzgekoppelter dsRNA40-Chol durchflusszytometrisch analysiert und um eine cholesterolinduzierte Immunreaktion auszuschließen, wurde dsRNA40-Chol durch 2'-O-Ribose-Methylierungen modifiziert und somit das Stimulationspotential der dsRNA40 inhibiert. Die Sequenzen der beiden komplementären RNA-Stränge sind Abbildung 4.20 zu entnehmen. Die Herstellung der verschiedenen doppelsträngigen RNA erfolgte wie unter 3.1.5 beschrieben. Die Generierung von dsRNA40-Chol erfolgte durch Annealing von ssRNA40-Chol sense mit ssRNA40 antisense, für dsRNA40 wurden ssRNA40 sense und ssRNA40 antisense aneinandergelagert und zur Herstellung von dsRNA40-Chol 2'-O-Methyl erfolgte die Annealingreaktion mit ssRNA40-Chol sense und ssRNA40 antisense 2'-O-Methyl. Die Annealingreaktionen wurde mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (3.1.7) und Schmelzkurvenanalyse (3.1.6) verifiziert (siehe Abbildungen 4.22 und 4.23).

Die Polyacrylamidgelelektrophorese zeigt die erfolgreiche Annealingreaktion der verschiedenen dsRNA40 mit geringer Kontamination von Einzelsträngen im Fall von dsRNA40-Chol 2'-O-Methyl. Die Schmelztemperatur aller verwendeten dsRNA40-Derivate lag deutlich über 37 °C, wodurch gezeigt werden konnte, dass eine temperaturbedingte Dissoziation während der Inkubationszeiten ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren führte weder die Cholesterolkopplung noch die 2'-O-Ribose-Methylierung zu einer veränderten Schmelztemperatur.

Im nächsten Schritt wurde die zelluläre Aufnahme von Alexa488-markierter dsRNA40-Chol durchflusszytometrisch überprüft. Die Cholesterolkopplung befand sich am 3'-Ende des ssRNA40 sense Stranges und die Fluoreszenzmarkierung befand sich am 3'-Ende des ssRNA40 antisense Stranges. Wt Flt3L-DC wurden mit 0,5 µM Alexa488-markierter dsRNA40-Chol für 1,5 Stunden inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Zum Vergleich wurden dsRNA40 ohne Cholesterolkopplung und mit Dotap komplexierte dsRNA40 mitgeführt (3.3.7). Innerhalb der B220<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> pDC kam es zu einer zellulären Aufnahme von dsRNA40-Chol

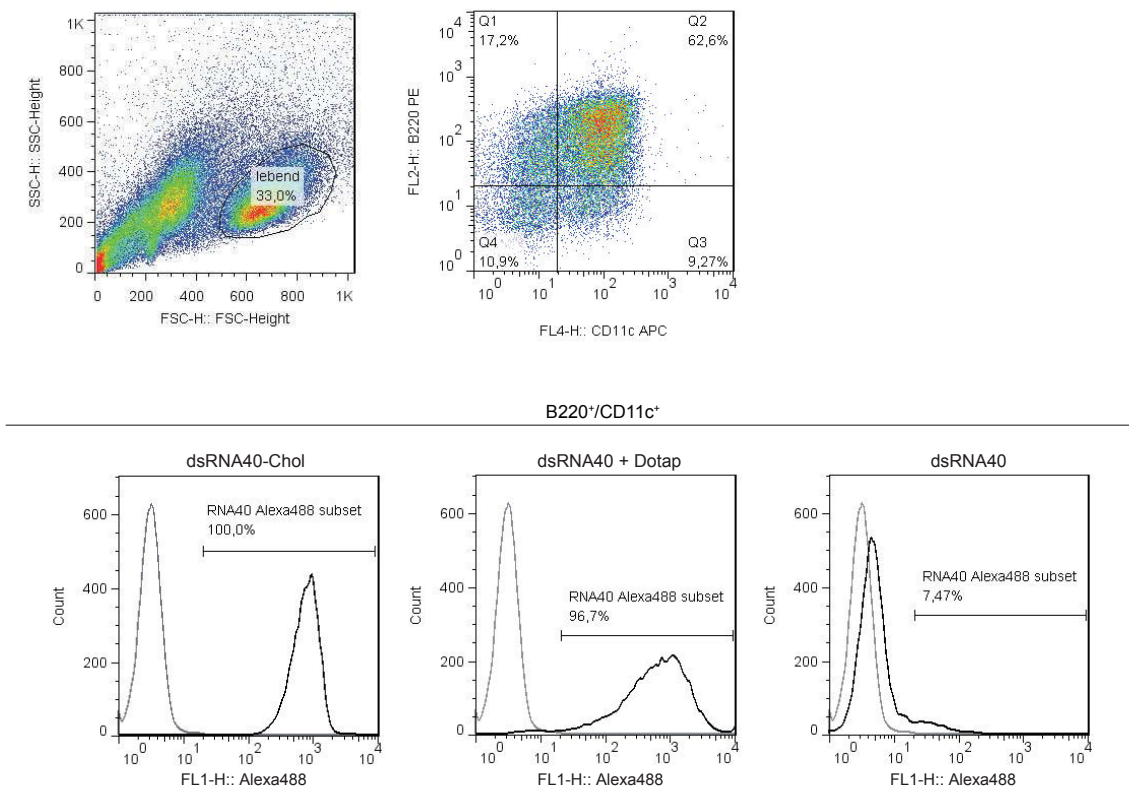


**Abbildung 4.22: Analyse der Annealingreaktion von dsRNA40-Chol mittels nicht-denaturierender PAGE.** 300 ng der verschiedenen RNA wurden auf ein 15 % iges Polyacrylamidgel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte mit SybrGold. Repräsentativ für zwei unabhängige Annealingreaktionen.



**Abbildung 4.23: Nachweis der Doppelsträngigkeit von dsRNA40-Chol.** 5 µg mit SybrGold gefärbte dsRNA40-Chol wurde der Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

durch 100 % der Zellen (Abbildung 4.24). Mit Dotap komplexierte dsRNA40 ohne Cholesterolkopplung zeigte im Vergleich eine zelluläre Aufnahme durch 96,7 % der Zellen und dsRNA40 wurde ohne Hilfsmittel nur von ca. 7,5 % der Zellen aufgenommen.



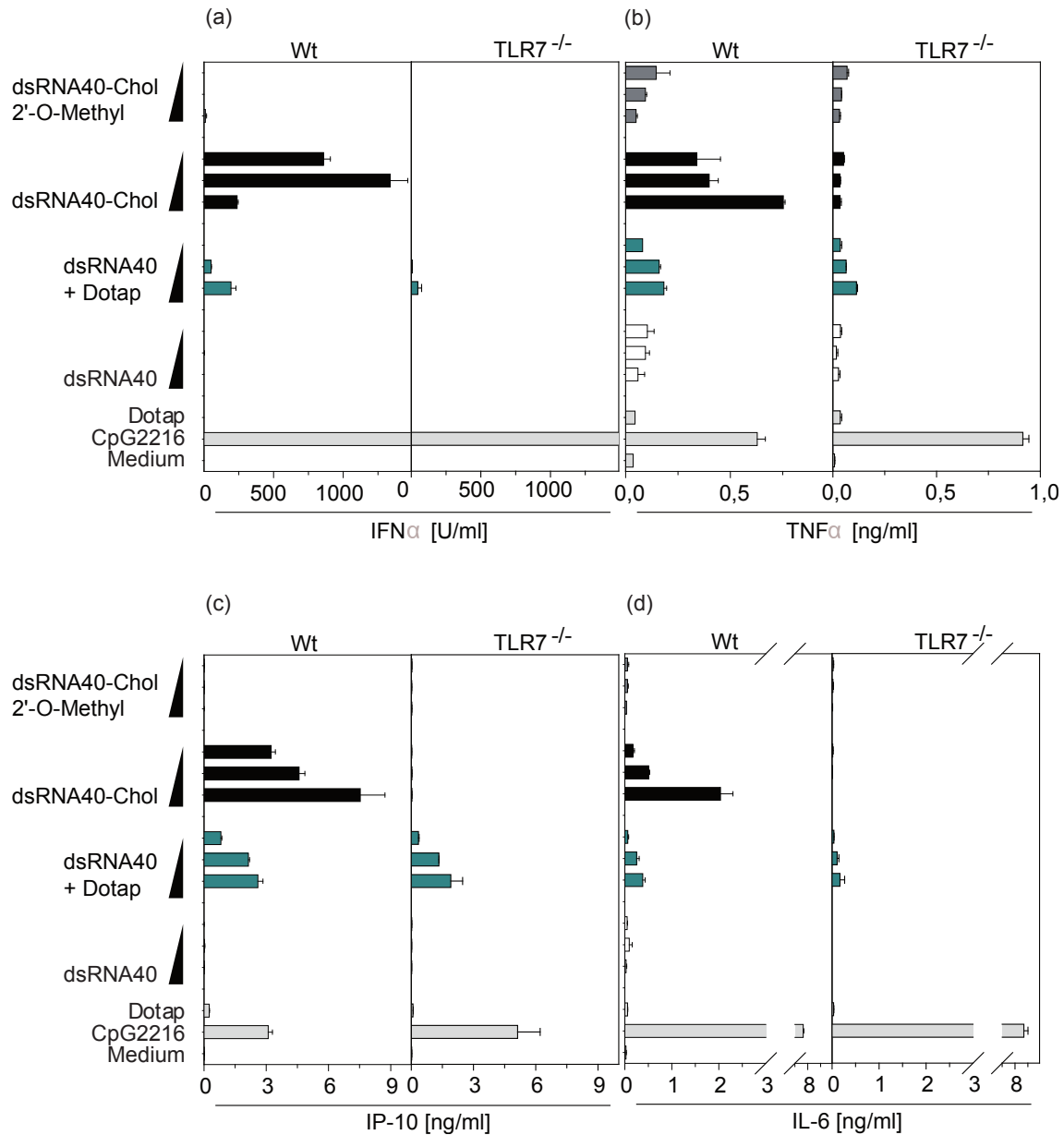
**Abbildung 4.24: Die zelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierter dsRNA40-Chol erfolgte in 100% der pDC.** Wt Flt3L-Kulturen wurden mit 0,5  $\mu$ M Alexa488-markierter dsRNA40-Chol, mit Dotap komplexierter dsRNA40 und mit dsRNA40 für 1,5 h inkubiert. Die Zellen wurden gegen die pDC-spezifischen Oberflächenmarker B220<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Zur Charakterisierung des immunstimulatorischen Potentials von dsRNA40-Chol wurden Wt und TLR7-defiziente Flt3L-DC stimuliert (3.3.7). TLR7 wurde bereits als Rezeptor für doppelsträngige siRNA beschrieben [Hornung et al. 2005; Judge et al. 2005; Sioud 2005]. Deshalb lag es nahe, das TLR7 als detektierender Rezeptor für dsRNA40-Chol in Betracht kam. Um einen cholesterolvermittelten immunstimulatorischen Effekt auszuschließen, wurde dsRNA40-Chol mit einer alternierenden

2'-O-Ribose-Methylierung zur Kontrolle eingesetzt. Die alternierende 2'-O-Ribose-Methylierung zur Inhibierung des immunstimulatorischen Potentials von siRNA wurde bereits beschrieben [Hamm et al. 2010]. Mit Dotap komplexierte dsRNA40 und dsRNA40 ohne Cholesterolkopplung oder Dotapkomplexierung wurden zum Vergleich mitgeführt.

Cholesterolkonjugierte doppelsträngige RNA40 führte zu einer deutlichen Induktion von antiviralem IFN $\alpha$  (Abbildung 4.25a). Für die Stimulationskonzentration von 0,5  $\mu$ M zeigte sich die höchste IFN $\alpha$ -Ausschüttung. Die durch dsRNA40-Chol induzierte IFN $\alpha$ -Sekretion fiel im Vergleich zum Zwei-Komponenten-System (mit Dotap komplexierte dsRNA40) deutlich stärker aus. Die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 wird ebenfalls durch dsRNA40-Chol eingeleitet (Abbildung 4.25b und Abbildung 4.25d). Auch hier zeigte sich ein deutlich stärkeres immunstimulatorisches Potential durch dsRNA40-Chol im Vergleich zum Zwei-Komponenten-System. Neben antiviralen und proinflammatorischen Zytokinen wurde das Chemokin IP-10 analysiert. Auch hier bestätigte sich die wesentlich potentere Induktion durch dsRNA40-Chol im Vergleich mit Dotap komplexierter dsRNA40 (Abbildung 4.25c).

Wie erwartet, erfolgte die Detektion von dsRNA40 durch TLR7. Für dsRNA40 ohne Träger war kein immunstimulatorisches Potential zu beobachten und eine cholesterolinduzierte Reaktion konnte durch Verwendung von dsRNA40-Chol mit alternierender 2'-O-Ribose-Methylierung ausgeschlossen werden, da weder Zytokine noch Chemokine durch diese modifizierte dsRNA40-Chol induziert wurden.



**Abbildung 4.25: Cholesterolkonjugierte dsRNA40 induziert eine Immunreaktion in Flt3L-DC in Abhängigkeit von TLR7.** Wt und TLR7-defiziente Flt3L-DC wurden mit dsRNA40 (weiße Balken), dsRNA40 im Komplex mit Dotap (dunkelgrüne Balken), dsRNA40-Chol (schwarze Balken) und dsRNA40-Chol 2'-O-Methyl (dunkelgraue Balken) stimuliert. Die Stimulationskonzentrationen betrugen 2,5  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M und 0,1  $\mu$ M. Die Analyse der Zytokin- bzw. Chemokinspiegel erfolgte nach 20-stündiger Inkubation mittels ELISA. Repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

---

# KAPITEL 5

---

## Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei Themenschwerpunkte behandelt. Zum einen wurde die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunantwort analysiert und zum anderen wurde das immunstimulatorische Potential von cholesterolgekoppelter RNA40 charakterisiert.

### 5.1 Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunität

Das angeborene Immunsystem detektiert einzelsträngige (ss) und doppelsträngige (ds) RNA und DNA über verschiedene pattern recognition receptors (PRR) wie RIG-I-like receptors (RLR), AIM2-like receptors (ALR), die Nukleotidyltransferase cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate) Synthase cGAS, den Rezeptor bzw. das Adaptermolekül stimulator of interferon genes (STING) und Toll-like receptors (TLR) [Gürtler et al. 2013].

Da RNA/DNA-Hybride während verschiedener endogener Prozesse sowie im Zusammenhang mit Infektionen und Autoimmunerkrankungen auftreten, gab es seit längerem die Vermutung, dass Hybride eine Immunantwort über PRR induzieren [Alarcón-Riquelme 2006; Crow et al. 2009; Rigby et al. 2008]. Bislang waren sowohl der Rezeptor als auch der eingeleitete Signalweg für die Detektion von RNA/DNA-Hybriden durch das angeborene Immunsystem unbekannt. In dieser Dissertation wurden zunächst synthetische RNA/DNA-Hybride viralen Ursprungs als Liganden für TLR9 identifiziert und anschließend Genome, welche Hybridstrukturen aufweisen, näher analysiert.

Zelleigenen Prozesse, in deren Verlauf RNA/DNA-Hybride gebildet werden, sind die Replikation des Kerngenoms, die Gentranskription, die Replikation der Telo-

mere, die Replikation des mitochondrialen Genoms und die Rekombination von Immunglobulin-Klassenswitch-Regionen [Clayton 2000; Mizuta et al. 2003; Shaw et al. 2008; B. Xu et al. 1996]. Durch fehlerhaften oder unvollständigen Abbau von endogenen Nukleinsäurespezies ist eine Akkumulation von endogenen RNA/DNA-Hybriden vorstellbar, welche eine Immunantwort induziert und somit zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen beiträgt. Mutationen der Nukleasen TREX1 und RNase H2 wurden im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses (SLE), familial chilblain lupus und dem Aicardi-Goutières-Syndrom beschrieben [Crow et al. 2006a; Crow et al. 2006b; Crow et al. 2009; Lee-Kirsch et al. 2007a; Lee-Kirsch et al. 2007b].

RNA/DNA-Hybride sind beispielsweise Bestandteil des Genoms des humanen Zytomegalievirus (HCMV) oder werden während retroviraler Replikationszyklen transient gebildet. Durch fehlerhafte Replikation oder durch Phagozytose- und Autophagieprozesse gelangen virale Nukleinsäuren in das endo-/lysosomale Kompartiment und leiten eine Immunantwort über nukleinsäuredetektierende TLR ein [H. K. Lee et al. 2007]. Die Replikation des DNA-Genoms des HCMV ist auf einen RNA-Primer angewiesen [Prichard et al. 1998; Rennekamp et al. 2011]. Die Initiation der Genomreplikation erfolgt während des lytischen Replikationszyklus am sogenannten oriLyt (origin of replication des lytischen Replikationszyklus), welcher RNA/DNA-Hybrid-Strukturen besitzt und für den lytischen Replikationszyklus von essentieller Bedeutung ist, da Virione, welche die Hybrid-Strukturen nicht besitzen, ineffizient replizieren [Anders et al. 1992; Prichard et al. 1998].

Im Verlauf einer retroviralen Infektion wird das virale einzelsträngige RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Währenddessen kommt es zur transienten Ausbildung von RNA/DNA-Hybriden. Die Reverse Transkriptase, ein viruseigenes Enzym katalysiert diese Reaktion [Baltimore 1970; Modrow 2010; Sarafianos et al. 2009]. Die Reverse Transkriptase fungiert zum einen während der reversen Transkription als RNA-abhängige DNA-Polymerase, zum anderen besitzt sie im Laufe der dsDNA-Synthese auch die Funktion einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Des Weiteren besitzt sie eine Helikase- und eine RNase H-Funktion. Aufgrund der RNase H-Funktion wird der RNA-Teil des entstehenden RNA/DNA-Hybrids relativ schnell abgebaut. Besondere RNA-Bereiche sind jedoch gegenüber der RNase H-Degradation wesentlich stabiler. Bei diesen Bereichen handelt es sich um die sogenannten Polypurintrakte (PPT), welche mindestens neun Adenosin- und Guanosinreste beinhalten und während der Initiierung der (+)DNA-Strang-Synthese als Primer fungieren [Fitzgerald et al. 2008; Rausch et al. 2004].



### 5.1.1 Synthetische RNA/DNA-Hybride induzieren eine Immunantwort über TLR9

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass TLR9 synthetische RNA/DNA-Hybride viralen Ursprungs detektiert. Originalsequenzen aus dem oriLyt des humanen Zytomegalievirus (Hybrid CMV27 und Hybrid CMV63) [Prichard et al. 1998] sowie eine Sequenz des Polypurintrakts von HIV (Hybrid HIVPPT) [Fitzgerald et al. 2008; Rausch et al. 2004] wurden näher analysiert.

Zunächst wurden Stimulationsexperimente im humanen System durchgeführt. Synthetische RNA/DNA-Hybride wurden aus komplementären Einzelsträngen generiert und deren Qualität überprüft. Die nichtdenaturierende Polyacrylamidgелеlektrophorese zeigte für alle Hybride ein einheitliches Bandenmuster mit geringfügigen Kontaminationen von Einzelsträngen (Abbildung 4.2). Eine effektive Hybridisierung wurde außerdem mit Hilfe des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 nachgewiesen (Abbildung 4.3) und die Stabilität der Hybride wurde sowohl unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) als auch unter endosomalen Bedingungen (pH 5,5) mittels Schmelzkurvenanalyse bestätigt (Abbildung 4.4).

Humane PBMC, welche in erster Linie aus Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen aber auch zu einem geringen Anteil aus pDC bestehen, wurden mit den verschiedenen RNA/DNA-Hybriden stimuliert. Es wurde nachgewiesen, dass RNA/DNA-Hybride im Komplex mit Dotap eine primär antivirale Immunantwort induzierten, welche durch die Sezernierung von IFN $\alpha$  gekennzeichnet war (Abbildung 4.5a). Korrespondierende ssDNA führten zwar ebenfalls zur IFN $\alpha$ -Sezernierung, jedoch in geringerem Ausmaß. Bei der Stimulation mit niedrigeren Konzentrationen zeigte sich eine deutlich stärkere IFN $\alpha$ -Induktion durch RNA/DNA-Hybride im Vergleich zur Induktion durch ssDNA. Einzelsträngige RNA führte nicht zur Produktion von IFN $\alpha$ . Demnach waren Einzelstrangkontaminationen nicht für den Stimulations-effekt verantwortlich. Das proinflammatorische Zytokin IL-6 wurde hingegen von humanen Immunzellen nicht ausgeschüttet (Abbildung 4.5b).

TLR9 wurde bereits als pattern recognition receptor beschrieben, welcher in die Detektion des Zytomegalievirus involviert ist. Für TLR9-defiziente Mäuse wurde eine erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit dem murinen Zytomegalievirus nachgewiesen, welche durch verminderte Typ I Interferon-Produktion und reduzierte NK-Zell-Aktivität gekennzeichnet ist [Krug et al. 2004; Tabeta et al. 2004]. Auch im Zusammenhang mit einer HIV-Infektion wurde bereits eine Rolle des TLR9 beschrieben. Es wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert, welche den Fortschritt der Infektion begünstigen oder einen Einfluss auf die Virusübertragung



von der Mutter auf das Kind besitzen [Bochud et al. 2007; Freguja et al. 2012; Ricci et al. 2010].

Zur näheren Charakterisierung des für die Detektion verantwortlichen Rezeptors wurden Stimulationsexperimente mit murinen Flt3L-DC durchgeführt. Flt3L-DC bestehen zu einem Großteil aus pDC, welche aufgrund der konstitutiven IRF7-Expression in der Lage sind, nach erfolgter PAMP-Detektion umgehend große Mengen an Typ I Interferonen zu produzieren. Deshalb eignen sich diese Zellen besonders gut für die Analyse einer antiviralen Immunantwort. Da RNA/DNA-Hybride bzw. die korrespondierenden Einzelstränge zur Stimulation mit Dotap komplexiert wurden und somit in erster Linie endosomale TLR als Rezeptoren in Frage kamen, wurden Flt3L-DC aus C57BL/6 (Wt) und TLR9-defizientem Knochenmark differenziert. Wildtyp Flt3L-DC reagierten, wie die humanen PBMC, nach Stimulation mit den synthetischen RNA/DNA-Hybriden CMV27, CMV63 und HIVPPT mit einer deutlichen IFN $\alpha$ -Ausschüttung (Abbildung 4.7a). Die Tatsache, dass die korrespondierenden ssRNA keine IFN $\alpha$ -Sekretion induzierten und ssDNA im Vergleich zu RNA/DNA-Hybriden zu deutlich schwächeren IFN $\alpha$ -Spiegeln in den Zellüberständen führten, verdeutlicht auch im murinen System, dass ssDNA- oder ssRNA-Kontaminationen innerhalb der Hybridpräparationen nicht für die IFN $\alpha$ -Induktion verantwortlich sein konnten. Mittels Schmelzkurvenanalyse wurde zusätzlich ausgeschlossen, dass eine temperatur- oder pH-bedingte Dissoziation der RNA/DNA-Hybride erfolgte (Abbildung 4.4). Außerdem konnte das intakte RNA/DNA-Hybrid CMV27 fluoreszenzmikroskopisch als punktuelle Färbung, welche auf endosomale Akkumulation hindeutet, nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Somit wurde ein Abbau des RNA/DNA-Hybrids durch endogene Nukleasen ebenfalls ausgeschlossen. Bei der Färbung wurden zur Kontrolle unbehandelte Flt3L-DC sowie mit ssRNA und ssDNA transfizierte Zellen mitgeführt. Da diese Zellen lediglich eine Kernfärbung zeigten, wurde zum einen ausgeschlossen, dass intrazellulär vorkommende RNA/DNA-Hybride angefärbt wurden und zum anderen wurde gezeigt, dass nach der Transfektion von einzelsträngigen Nukleinsäuren keine intrazelluläre Hybridisierung der Einzelstränge zu RNA/DNA-Hybrid-Strukturen erfolgte.

Im murinen System wurde nach RNA/DNA-Hybrid-Stimulation sowohl eine antivirale Immunantwort als auch eine proinflammatorische, durch die Sekretion von TNF $\alpha$  gekennzeichnete Immunreaktion eingeleitet (Abbildung 4.7b). Das Chemokin IP-10 wurde ebenfalls nach Stimulation mit RNA/DNA-Hybriden von murinen Flt3L-DC ausgeschüttet (Abbildung 4.7c). Die korrespondierenden ssDNA der synthetischen RNA/DNA-Hybride führten neben der Sekretion von IFN $\alpha$  auch

zur Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  und IP-10. Das äquivalente Stimulationspotential war jedoch mit Ausnahme von IP-10 geringer als das durch RNA/DNA-Hybride induzierte. Die korrespondierenden ssRNA führten lediglich zu einer Ausschüttung von IP-10, welche im Vergleich zur RNA/DNA-Hybrid-induzierten Sezernierung ebenfalls deutlich schwächer war. Die Detektion und die anschließende Zytokininduktion durch alle untersuchten RNA/DNA-Hybride erfolgte über TLR9 (Abbildung 4.7a, b und c). Auch die Erkennung der korrespondierenden ssDNA und interessanterweise auch die IP-10-Induktion durch ssRNA wurden durch TLR9 vermittelt. DNA wurde bereits ausführlich als Ligand für TLR9 beschrieben, für ssRNA wurde dies bisher nicht gezeigt [Bauer et al. 2001; Boulé et al. 2004; Dalpke et al. 2006; Haas et al. 2008; Hemmi et al. 2000; Yasuda et al. 2005].

Der Nachweis der direkten Interaktion zwischen TLR9 und RNA/DNA-Hybriden wurde in einer ELISA-basierten Bindungsstudie erbracht. Bisher wurden Bindungsstudien mit ssDNA und Plasmid-DNA unter Verwendung der vollständigen extrazellulären TLR9-Domäne oder der prozessierten C-terminalen TLR9-Domäne durchgeführt. In diesen Studien konnte verifiziert werden, dass Oligonukleotide mit Phosphodiester-Rückgrat mit starker Affinität an die vollständige extrazelluläre TLR9-Domäne binden, wohingegen die Interaktion von DNA mit der C-terminalen TLR9-Domäne deutlich schwächer ist [Cornélie et al. 2004; Kindrachuk et al. 2007; Li et al. 2012; Rutz et al. 2004]. Einige Studien erklären die Prozessierung der extrazellulären TLR9-Domäne durch Cathepsine und die Asparaginendopeptidase für die Aktivierung des Rezeptors und die nachfolgende Rekrutierung von Signalmolekülen wie MyD88 für unabdingbar [Asagiri et al. 2008; Ewald et al. 2011; Ewald et al. 2008; Matsumoto et al. 2008; Park et al. 2008; Sepulveda et al. 2009]. Kürzlich wurde hingegen beschrieben, dass der N-terminale Bereich von TLR9 für die Aktivierung des Rezeptors von großer Bedeutung ist und auch nach erfolgter Prozessierung mit dem C-terminalen Anteil assoziiert bleibt [Onji et al. 2013]. Die Notwendigkeit der Prozessierung des TLR9 wird kontrovers diskutiert und die Studienlage ist bislang nicht eindeutig [Bauer 2013]. Für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführte Bindungsstudie wurde die Bindung an die vollständige extrazelluläre Domäne des mTLR9 untersucht. Die spezifische konzentrationsabhängige Bindung des RNA/DNA-Hybrids MuLV43 an die extrazelluläre mTLR9-Domäne eines mTLR9-IgG-Fc-Fusionsproteins wurde belegt (Abbildung 4.11). Das RNA/DNA-Hybrid zeigte sogar eine stärkere Bindung an mTLR9 als der bekannte TLR9-Ligand CpG1668. Jedoch korreliert die Bindungsstärke eines Liganden an den entsprechenden Rezeptor nicht zwangsläufig mit dessen immunstimulatorischem Potential, wie

auch aus Bindungsstudien mit TLR9-inhibitorischen Oligonukleotiden hervorgeht [Ashman et al. 2011]. Einzelsträngige RNA zeigte keine Bindung an mTLR9, die korrespondierende ssDNA hingegen zeigte die stärkste Bindung innerhalb der analysierten Nukleinsäuren. Als Negativkontrolle wurde ein mTLR2-IgG-Fc-Fusionsprotein mitgeführt.

In einer kürzlich erschienenen Studie wurde zum einen eine synthetische repetitive GU-reiche RNA-Sequenz als Grundlage eines RNA/DNA-Hybrids ausgewählt und zum anderen eine Sequenz aus dem *gag*-Gen von HIV-1. Die TLR9-abhängige Induktion einer Immunantwort in Flt3L-DC wurde ebenso nachgewiesen wie die intrazelluläre Akkumulation von intakten RNA/DNA-Hybriden. Außerdem konnte die Einleitung einer RNA/DNA-Hybrid-vermittelten Immunantwort *in vivo* gezeigt werden [Rigby et al. 2014]. Die beschriebene Studie bestätigt die in dieser Dissertation nachgewiesene Detektion von RNA/DNA-Hybriden durch TLR9.

### **5.1.2 RNA/DNA-Hybride als Bestandteil verschiedener Genome sind nicht primär für die Einleitung einer Immunantwort verantwortlich**

Zur Untersuchung des Einflusses der beschriebenen RNA/DNA-Hybrid-Strukturen innerhalb des HCMV-Genoms [Anders et al. 1992; Prichard et al. 1998] wurde neben den synthetischen RNA/DNA-Hybriden das immunstimulatorische Potential des vollständigen HCMV-Genoms untersucht. Wildtyp Flt3L-DC wurden mit dem viralen HCMV-Genom und im Vergleich dazu mit bacterial artificial chromosome (BAC) DNA, welche im Gegensatz zu dem viralen HCMV-Genom keine RNA/DNA-Hybrid-Strukturen beinhaltet, stimuliert. Das immunstimulatorische Potential zeigte jedoch keine Unterschiede im Bezug auf die Sezernierung von IFN $\alpha$  (Abbildung 4.12). Es ist davon auszugehen, dass das immunstimulatorische Potential, welches durch die RNA/DNA-Hybrid-Strukturen innerhalb des HCMV-Genoms repräsentiert wird, durch den stimulatorischen Effekt des viralen DNA-Genoms überlagert wird.

Um den Einfluss endogen vorkommender RNA/DNA-Hybride näher zu investigieren, wurden mitochondriale Genome in Stimulationsexperimenten verwendet. Die Erbsubstanz der Mitochondrien besitzt ein stabiles RNA/DNA-Hybrid (R-Loop) am Ursprung der Leitstrang-DNA-Replikation, welches aus der elterlichen dsDNA und einem RNA-Transkript besteht. Diese drei miteinander interagierenden Nukleinsäurestränge sind für die Replikationsinitiation des mitochondrialen Genoms essentiell [Clayton 2000].

Zur weitergehenden Analyse des immunstimulatorischen Potentials von mtGenomen, welche RNA/DNA-Hybrid-Strukturen beinhalten, wurden Wildtyp Flt3L-DC stimuliert. Mit Hilfe des anti-RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 wurden zunächst RNA/DNA-Hybride im mitochondrialen Genom nachgewiesen, welche durch den Verdau mit dem Enzym RNase H erwartungsgemäß abgebaut werden konnten (Abbildung 4.13). Das immunstimulatorische Potential von mtGenomen zeigte jedoch für verschiedene Stimulationskonzentrationen keinen Unterschied im Vergleich zu RNase H-verdauten mtGenomen. Auch in diesem Fall scheint, wie bereits für das HCMV-Genom beschrieben, der durch RNA/DNA-Hybrid-Strukturen induzierte immunstimulatorische Effekt durch das enorme Stimulationspotential der genomischen mtDNA überlagert zu werden. Außerdem konnte unter Verwendung von TLR9-defizienten Flt3L-DC gezeigt werden, dass die Detektion des mtGenoms nicht ausschließlich über TLR9 erfolgte. Diese Beobachtung wurde aber nicht weitergehend untersucht.

Mitochondriale DNA (mtDNA) wurde bereits als DAMP beschrieben. Sowohl für humane als auch für murine mtDNA wurde gezeigt, dass nach intraartikulärer Injektion von mtDNA eine durch Monozyten bzw. Makrophagen vermittelte Arthritis in Mäusen induziert wird. Außerdem wurde in der Gelenkflüssigkeit von Patienten, welche an rheumatoider Arthritis leiden, extrazelluläre mtDNA nachgewiesen. Nicht-methylierte CpG-Motive innerhalb des mitochondrialen Genoms sollen für dieses inflammatorische Potential verantwortlich sein [Collins et al. 2004]. Außerdem spielen durch Verletzungen frei werdende mitochondriale DAMP eine Rolle während der nachfolgenden Entstehung von Entzündungen. Es wurde beschrieben, dass mitochondriale DNA neutrophile Granulozyten über TLR9 aktiviert. Hier wurde ein enger Zusammenhang zwischen Traumata, Entzündungen und systemischem inflammatorischem Response-Syndrom nachgewiesen [Q. Zhang et al. 2010]. Des Weiteren wurde eine direkte Korrelation zwischen der Viruslast während einer HIV-Infektion und dem Plasmaspiegel von mtDNA gezeigt. Der Plasmaspiegel von mtDNA zeigt die virusinduzierte Zellschädigung an [Cossarizza et al. 2011]. Eine weitere Studie beschreibt den Zusammenhang zwischen beschädigten Mitochondrien und Herzinsuffizienz. Kardiomyozyten bauen durch hämodynamischen Stress beschädigte Mitochondrien ab. Mitochondriale DNA, welche diesem Abbauprozess entkommt, führt in Kardiomyozyten in Abhängigkeit von TLR9 zu entzündlichen Erkrankungen des Herzmuskels [Oka et al. 2012].

Bakterielle DNA ist als Ligand für TLR9 bereits bekannt [Bauer et al. 2001; Dalpke et al. 2006; Hemmi et al. 2000]. Zur Replikation des bakteriellen Genoms werden

RNA-Primer benötigt, wodurch RNA/DNA-Hybrid-Strukturen transient gebildet werden. Der RNA-Anteil der RNA/DNA-Hybrid-Bereiche wird durch das Enzym RNase H abgebaut. Aus diesem Grund wurden Nukleinsäuren aus dem RNase HI und RNase HII defizienten *E.coli*-Stamm MIC2067 aufgereinigt und sowohl der Gehalt an RNA/DNA-Hybriden als auch das immunstimulatorische Potential im Vergleich zu Nukleinsäuren des Wildtyp-Stamms untersucht [Itaya et al. 1999]. Außerdem erfolgte die Aufreinigung der Genome während verschiedener bakterieller Wachstumsphasen. Da während der exponentiellen Wachstumsphase die maximale Teilungsrate vorliegt, welche mit erhöhter Replikation einhergeht, lag die Vermutung nahe, dass in dieser Wachstumsphase ein deutlich erhöhter Gehalt an RNA/DNA-Hybriden vorkommt.

Die bakteriellen Genome wurden mit Hilfe des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 auf vorhandene RNA/DNA-Hybride analysiert (Abbildung 4.14). Es zeigte sich jedoch, dass weder Unterschiede im RNA/DNA-Hybrid-Gehalt zwischen den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen noch im Vergleich zwischen Wildtyp- und dem RNase H-defizienten Stamm vorlagen. Auch die Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials zeigte keinerlei Unterschiede im Bezug auf die Sernierung von IFN $\alpha$ , IL-6 und IP-10 (Abbildung 4.15). Der Verdau der bakteriellen Genome mit dem Enzym RNase H zeigte zwar im ELISA-basierten Nachweissystem eine deutliche Reduktion des RNA/DNA-Hybrid-Gehalts, das immunstimulatorische Potential der bakteriellen Genome blieb jedoch auch nach RNase H-Verdau unverändert (Abbildung 4.16). Vermutlich wird auch in diesem System die Immunstimulation maßgeblich durch den DNA-Gehalt bestimmt. Der Anteil der bakteriellen RNA/DNA-Hybride am immunstimulatorischen Potential konnte unter diesem experimentellen Ansatz nicht genauer analysiert werden.

Bisher konnte ein TLR9-vermitteltes immunstimulatorisches Potential nur durch synthetische RNA/DNA-Hybride nachgewiesen werden. Für virale, bakterielle oder mitochondriale Genome, welche RNA/DNA-Hybrid-Strukturen beinhalten, konnte der Einfluss der RNA/DNA-Hybride auf die Immunstimulation nicht näher analysiert werden. Vermutlich wird der immunstimulatorische Anteil der RNA/DNA-Hybride durch den wesentlich höheren Anteil an immunstimulatorischer genomischer DNA überlagert.

### 5.1.3 RNA/DNA-Hybride sind in retrovirusinfizierten Flt3L-DC nachweisbar, die retrovirale Infektion leitet aber keine antivirale Immunantwort ein

Im nächsten Schritt wurden Flt3L-DC während einer retroviralen Infektion näher untersucht. Durch Verwendung des synthetischen RNA/DNA-Hybrids HIVPPT konnte bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein synthetisches RNA/DNA-Hybrid, welches den Polypurintrakt des HIV imitiert, die Sezernierung von IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  und IP-10 induziert (Abbildung 4.7).

Wildtyp Flt3L-DC wurden mit GFP-markiertem Mo-MuLV infiziert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab innerhalb der B220<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> pDC eine Infektionsrate von ca. 50 % der Zellen (Abbildung 4.17a). Des Weiteren wurde die Akkumulation von retroviralen RNA/DNA-Hybriden unter Verwendung des RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers S9.6 fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (Abbildung 4.17b). Die Induktion einer antiviralen Immunantwort in Wildtyp Flt3L-DC durch Mo-MuLV blieb jedoch aus (Abbildung 4.18a). Aufgrund dieser Tatsache gestaltete sich der Vergleich des immunstimulatorischen Potentials von RNA/DNA-Hybriden in Wildtyp und TLR9-defizienten Flt3L-DC während einer retroviralen Infektion schwierig. Eine 2011 erschienene Studie zeigte ebenfalls, dass die Infektion mit Mo-MuLV *in vivo* nicht zu einer Hochregulation von interferonabhängigen anti-retroviralen Proteinen wie Tetherin führt [Liberatore et al. 2011]. Im Gegensatz zur retroviralen Mo-MuLV-Infektion im murinen System wurde für das humane System die IFN $\alpha$ -Produktion durch inaktiviertes HIV in PBMC beschrieben [Mandl et al. 2008]. Eine weitere Untersuchung zeigte die Aktivierung von humanen pDC durch HIV, welche unter anderem durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen und der Sezernierung von Typ I Interferonen und TNF $\alpha$  gekennzeichnet war. In dieser und einer weiteren Untersuchung wurde TLR7 als Rezeptor der viralen RNA definiert [Beignon et al. 2005; Meier et al. 2007]. Es wurde aber auch ein immunstimulatorisches Potential von unvollständigen Replikationsintermediaten, welche während eines fehlerhaften HIV-1-Replikationszyklus entstehen, nachgewiesen [Doitsh et al. 2010]. Jedoch konnte der für die Detektion verantwortliche Rezeptor bisher nicht identifiziert werden.

Normalerweise ist die Induktion einer antiviralen IFN-vermittelten Immunantwort essentiell für die Abwehr einer viralen Infektion. Im Falle der HIV-Infektion ist die Produktion von Typ I IFN in T-Lymphozyten und Makrophagen jedoch inhibiert, wodurch eine produktive virale Infektion in diesen Zellen etabliert werden kann. Die anhaltende IFN-Produktion durch pDC hingegen führt zur chroni-



sche Aktivierung des Immunsystems, welche kennzeichnend für den Fortschritt des Krankheitsverlaufs ist [Marsili et al. 2012].

Derzeit ist nicht geklärt, weshalb durch Mo-MuLV keine Typ I Interferon-Produktion induziert wird. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Mo-MuLV auf die durch den bekannten TLR9-Liganden CpG2216 induzierten IFN $\alpha$ -Ausschüttung durch Wildtyp Flt3L-DC untersucht. In der Tat konnte durch Vorinkubation der Flt3L-DC mit Mo-MuLV eine konzentrationsabhängige Inhibition der CpG2216-vermittelten IFN $\alpha$ -Sekretion festgestellt werden (Abbildung 4.18b).

Um den Mechanismus, welcher zur Inhibition der IFN $\alpha$ -Sekretion durch Mo-MuLV führte, einzugrenzen, wurden sowohl Siglec-H- als auch DAP12-defiziente Flt3L-DC differenziert. Mehrere Oberflächenrezeptoren assoziieren mit DAP12, welches ein ITAM-besitzendes Adaptermolekül ist und in pDC modulierend in die IFN-Signalkaskade eingreift [Bao et al. 2013]. Siglec-H, ein selektiv auf murinen pDC exprimierter Oberflächenrezeptor, nutzt DAP12 als Adaptermolekül. Für den Oberflächenrezeptor Siglec-H konnte bereits gezeigt werden, dass die antikörpervermittelte Rezeptorligation zu einer verminderten TLR9-induzierten Typ I IFN-Sekretion führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass DAP12-defiziente murine pDC den Oberflächenrezeptor Siglec-H nicht exprimieren. Diese Zellen sezernieren nach TLR9-Stimulation größere Mengen an Interferonen als Wildtyp pDC [Blasius et al. 2006; Pillai et al. 2012].

Ein inhibitorischer Mechanismus, welcher über Siglec-H bzw. einen weiteren Rezeptor, welcher über das Adaptermolekül DAP12 in die Interferonsignalkaskade eingreift, konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.19). Wie bereits für Wildtyp Flt3L-DC gezeigt (Abbildung 4.18), führte auch die Vorinkubation der Siglec-H- und DAP12-defizienten Flt3L-DC mit Mo-MuLV zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der durch CpG2216 induzierten IFN $\alpha$ -Ausschüttung.

Zur weiteren Analyse ist die Aufklärung des Mechanismus, über welchen die IFN $\alpha$ -Ausschüttung durch Mo-MuLV inhibiert wird, von essentieller Bedeutung. Unter Verwendung entsprechender Mausstämmen könnte der Einfluss von retroviralen RNA/DNA-Hybriden auf die Einleitung einer antiviralen Immunantwort genauer untersucht werden. Um den retroviralen Liganden, welcher für die Inhibition der IFN $\alpha$ -Ausschüttung verantwortlich ist, zu charakterisieren, können mutierte Retroviren verwendet werden. Bereits 1985 wurde die Inhibition der Lymphozytenproliferation durch ein synthetisches Peptid, welches homolog zu retroviralen Hüllproteinen ist, beschrieben [Cianciolo et al. 1985]. Immunsuppressive Eigenschaften wurden außerdem *in vivo* für Hüllproteine von Mo-MuLV nachgewiesen [Mangeney et al. 1998]

und später konnte gezeigt werden, dass von endogenen Retroviren kodierte Hüllproteine ebenfalls immuninhibitorische Eigenschaften besitzen [Mangeney et al. 2001]. Des Weiteren ist innerhalb des Glykoproteins 41 (gp41), einer Untereinheit des retroviralen Hüllproteinkomplexes, eine hochkonservierte immunsuppressive Domäne (isu-Domäne) vorhanden, welche modulierend auf die Zytokinausschüttung wirkt [Denner et al. 2013]. Ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit Retroviren und TLR9 wurde im Rahmen dieser Dissertation bereits näher beschrieben. Außerdem wird die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen durch genetische Studien bekräftigt, welche eine Rolle des TLR9 in der HIV-vermittelten Immundetektion und somit im klinischen Verlauf einer HIV-Infektion aufdeckten. Es wurden zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism) im TLR9-Gen identifiziert, welche in engem Zusammenhang mit einem schnellen Fortschreiten der HIV-1 Infektion stehen. Es handelt sich um die beiden Einzelnukleotid-Polymorphismen 1635A/G und +1174G/A [Bochud et al. 2007; Freguja et al. 2012]. Die Bedeutung des TLR9 1635A/G Einzelnukleotid-Polymorphismus wurde im Rahmen einer weiteren Studie ebenfalls analysiert. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen diesem TLR9 Einzelnukleotid-Polymorphismus, der Anzahl CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der Viruslast [Soriano-Sarabia et al. 2008]. Des Weiteren wurde eine Korrelation zwischen spezifischen genetischen TLR9-Varianten und dem Risiko der Virusübertragung von der Mutter auf das Kind beschrieben. Das angeborene Immunsystem und insbesondere TLR9 spielen daher eine zentrale Rolle in der perinatalen HIV-Infektion [Ricci et al. 2010]. Weiterhin wurde der Polymorphismus G520R des TLR9 in Assoziation mit der Infektion durch Lentiviren der kleinen Wiederkäuer (small ruminant lentiviruses) gebracht, von deren Infektionen Schafe häufig betroffen sind [Sarafidou et al. 2013].

## 5.2 Das Potential cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans

Die Entwicklung von Impfstoffen ist für die Prävention von Infektionskrankheiten von großer Bedeutung. Adjuvantien kommen zum Einsatz, um die Wirkung eines Impfstoffes unspezifisch zu verstärken und somit die Immunreaktion zu verbessern. Die Induktion einer spezifischen Immunantwort wird durch den Impfstoff erzielt, die Stärke der Immunreaktion wird durch das eingesetzte Adjuvans mitbestimmt.

Bisher sind nur wenige Adjuvantien als Wirkverstärker von humanen Impfstoffen zugelassen. Aluminiumhydroxid (Alum) beispielsweise verstärkt die Antigen-



aufnahme durch antigenpräsentierende Zellen, verlängert die Antigenpräsentation und hat somit einen fördernden Einfluss auf die Aktivierung von T-Lymphozyten [Ghimire et al. 2012; McKee et al. 2013]. Aluminiumhydroxid wird als Adsorptionsmittel in inaktivierten Impfstoffen wie den Tetanus-, Diphtherie-, Pertussis- und Hepatitis A-Impfstoffen verwendet. MF59, ein weiteres zugelassenes Adjuvans, wird im Influenza-Impfstoff Fludax eingesetzt. Bei diesem Adjuvans handelt es sich um eine Öl-in-Wasser-Emulsion, welche Squalen, Polysorbat 80 und Sorbitantriolat enthält und sich positiv auf die Antigenaufnahme durch Immunzellen auswirkt. Ein weiteres Adjuvans, AS03, besitzt ähnliche Eigenschaften wie MF59. Das Adjuvans AS04, als kombiniertes Adjuvans, ist ein Komplex aus Aluminiumhydroxid und Monophosphoryl-Lipid A, welches TLR4 aktiviert. AS04 ist Bestandteil im Hepatitis B-Impfstoff Fendrix und im HPV (humane Papillomviren)-Impfstoff Cervarix.

Die Entwicklung von Adjuvantien ist von zentraler Bedeutung, um ein breiteres Repertoire an Wirkverstärkern bereitzustellen, welche die gezielte Einleitung von humoralen und zellulären Immunantworten ermöglichen, ohne unerwünschte Nebenwirkungen aufzuweisen. Obwohl die Gewährleistung der Sicherheit von Impfstoffen oberste Priorität besitzt, besteht beispielsweise für den Influenzaimpfstoff Pandemrix, welcher das Adjuvans AS03 enthält, der Verdacht, dass bei Kindern durch diesen Impfstoff Narkolepsie ausgelöst wird [Nohynek et al. 2012; Partinen et al. 2012]. Im Zusammenhang mit dem sogenannten Golfkriegssyndrom, welches sich bei Betroffenen durch Ermüdungserscheinungen, neurokognitive Beschwerden und Muskelschmerzen äußerte, wurde dem Verdacht von Impffolgen nachgegangen. Ein Einfluss des Anthrax-Impfstoffs, welcher Squalen als Adjuvans enthielt, und den Soldaten verabreicht worden war, konnte jedoch ausgeschlossen werden [Phillips et al. 2009].

Sowohl natürliche als auch synthetische TLR-Liganden besitzen das Potential als Adjuvantien eingesetzt zu werden und befinden sich bereits in der experimentellen Verwendung. Da TLR-Liganden schon seit Beginn der Impfstoffentwicklung unwissentlich als Wirkverstärker zum Einsatz kamen, besitzt die Entwicklung von TLR-basierten Adjuvantien ein enormes Potential. Die verschiedenen TLR werden zelltypspezifisch exprimiert und induzieren somit nach Ligandenbindung unterschiedliche Zytokinprofile, welche die Eigenschaften der Adjuvantien maßgeblich beeinflussen. Deshalb ist die Untersuchung weiterer TLR-Liganden als Adjuvantien von zentraler Bedeutung. Der Gelbfieberimpfstoff YF-17D zeigt außerdem, dass die Kombination von verschiedenen TLR-Liganden als Adjuvans einen deutlichen Vorteil darstellt. Dieser Impfstoff, ein attenuierter Lebendimpfstoff, gehört zu den effektivsten bekannten Vakzinen und ist in der Lage verschiedene dendritische Zellen

über TLR2, TLR7, TLR8 und TLR9 zu aktivieren, woraufhin IL-12, IL-6 und IFN $\alpha$  induziert werden [Querec et al. 2006]. Die Effektivität dieses Impfstoffes spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass eine einzige Impfdosis bei 99 % der immunisierten Menschen ausreichenden Schutz vor einer Gelbfieberinfektion bietet. Antikörper konnten sogar 35 Jahre nach der Immunisierung nachgewiesen werden [Poland et al. 1981]. Im Tiermodell konnten bereits erste Daten zur simultanen Verwendung von TLR2/6-, TLR3- und TLR9-Liganden erhoben werden [Zhu et al. 2010].

In der Entwicklung von Hepatitis B- und Influenza-Impfstoffen werden bereits synthetisch hergestellte CpG DNA-Sequenzen untersucht. Aluminiumhydroxid als Adjuvans eines kommerziellen Hepatitis B-Impfstoffes wurde im klinischen Test durch eine immunstimulatorische CpG DNA-Sequenz mit Phosphothioat-Rückgrat ersetzt. Die intramuskuläre Injektion führte zu einem deutlich früheren Nachweis von HBsAg- (hepatitis B surface antigen) spezifischen Antikörpern und zu höheren Raten an zytotoxischen T-Lymphozyten im Vergleich zum bekannten Impfstoff [Halperin et al. 2006]. Auch in Phase III der Studie bestätigten sich diese Beobachtungen [Eng et al. 2013].

### **5.2.1 Cholesterolkonjugierte doppelsträngige RNA40 induziert eine Immunantwort in Flt3L-DC und wird über TLR7 detektiert**

RNA40 wurde bereits als TLR7-Ligand beschrieben [Heil et al. 2004]. Es handelt sich bei RNA40 um eine guanosin- und uridinreiche RNA aus der U5 Region des HIV-1. Zur Generierung von effektiven TLR-basierten Adjuvantien muss deren Stabilität und die Aufnahme durch Immunzellen gewährleistet werden. Im Falle des TLR7-Liganden RNA40 wird dies experimentell zur Zeit durch liposomale Transfektionsreagenzien erreicht. Für ssRNA40 im Komplex mit Dotap konnte *in vivo* tierexperimentell gezeigt werden, dass sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort induziert wird [Hamm et al. 2007]. Da Transfektionsreagenzien zelltoxische Eigenschaften und weitere unerwünschte Nebeneffekte besitzen, sind sie für die Zulassung als Adjuvans von humanen Impfstoffen problematisch. In einer weiteren Studie wurde das immunstimulatorische Potential von ssRNA mit Phosphothioat-Rückgrat im Vergleich zu ssRNA, welche durch kationische Proteine vor sofortiger Degradierung durch Nukleasen geschützt war, untersucht [Scheel et al. 2004]. Einzelsträngige RNA mit Phosphothioat-Rückgrat konnte in dieser Studie als transfektionsreagenzienunabhängiges PAMP identifiziert werden. Die Verwendung

von cholesterolkonjugierter dsRNA40, die in dieser Dissertation untersucht wurde, besitzt im Bezug zur Anwendung als Adjuvans den entscheidenden Vorteil, dass die zelluläre Aufnahme direkt forciert wird, was im Falle von phosphothioatmodifizierter RNA nicht geschieht.

Für die Experimente im Rahmen dieser Dissertation wurde synthetische cholesterolgekoppelte RNA40 verwendet. Cholesterol kommt natürlicherweise im menschlichen Körper als Bestandteil der Plasmamembranen, deren Stabilität durch Einlagerungen von Cholesterol erhöht wird, vor. Da Cholesterol in Membranen eingelagert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die zelluläre Aufnahme eines TLR-Liganden durch die Kopplung an Cholesterol forciert werden kann. Zudem wurde bereits beschrieben, dass für den Transport von immunstimulatorischer RNA deren Stabilität und Löslichkeit durch Verwendung von Nanopartikeln, welche Polyethylenglycol und Cholesterol beinhalten, erhöht wird [Nguyen et al. 2012]. In diesem Fall handelt es sich jedoch nicht um eine direkte Bindung der RNA an Cholesterol. Bisher wurde die Verwendung von cholesterolkonjugierten RNA-Molekülen nur im Zusammenhang mit siRNA beschrieben, um Genmodulationen auszulösen [Soutschek et al. 2004].

Für anfängliche Untersuchungen wurde cholesterolgekoppelte ssRNA40 mit Phosphodiester-Rückgrat (ssRNA40-Chol) verwendet. Flt3L-DC wurden mit ssRNA40-Chol und zum Vergleich mit ssRNA40-Chol im Komplex mit Dotap stimuliert (Abbildung 4.21). Unkomplexierte ssRNA40-Chol induzierte weder die Produktion von IFN $\alpha$ , noch die Sezernierung von IL-6. Für TNF $\alpha$  und IP-10 konnte hingegen eine moderate Induktion festgestellt werden, wodurch dennoch ein Hinweis auf das immunstimulatorische Potential von cholesterolgekoppelter RNA40 gegeben war. Die Komplexierung von ssRNA40-Chol mit Dotap führte hingegen zu einer moderaten IFN $\alpha$ -Sezernierung, sowie zu einer deutlichen Induktion von TNF $\alpha$ , IP-10 und IL-6. Vermutlich konnte ssRNA40-Chol nicht in ausreichender Menge von den Flt3L-DC aufgenommen werden und/oder ssRNA40-Chol besaß keine ausreichende Stabilität gegenüber dem intrazellulären Abbau durch RNasen, welche im Falle der Dotapkomplexierung gegeben war.

Für weitere Experimente wurde cholesterolkonjugierte doppelsträngige RNA40 verwendet (dsRNA40-Chol), da doppelsträngige RNA-Moleküle deutlich stabiler sind als einzelsträngige RNA-Moleküle. Der RNA40 sense-Strang der dsRNA40-Chol war am 3'-Ende mit Cholesterol gekoppelt und die erfolgreiche Annealingreaktion wurde mittels nicht-denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Abbildung 4.22) und der Schmelzkurvenanalyse (Abbildung 4.23) überprüft. Durch die Schmelzkurvenanalyse wurden die Doppelsträngigkeit und die Stabilität der Mole-

küle bei 37 °C nachgewiesen. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass weder die Cholesterolkopplung noch die 2'-O-Ribose-Methylierung der dsRNA40, welche verwendet wurde, um das immunstimulatorische Potential der Nukleinsäuren zu inhibieren, einen Einfluss auf das Schmelzverhalten besaßen.

Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierter dsRNA40-Chol wurde die zelluläre Aufnahme bzw. die Bindung von dsRNA40-Chol an die Zellmembran von B220<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup> pDC durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abbildung 4.24). Die zelluläre Aufnahme bzw. die Bindung von dsRNA40-Chol erfolgte durch 100 % der Zellen, wodurch die Hypothese der cholesterolvermittelten Aufnahme bestätigt wurde. Diese enorme Effizienz wurde durch doptapkomplexierte dsRNA40 nicht übertroffen. Ohne Hilfsmittel wurde dsRNA40 hingegen nur von ca. 7,5 % der Zellen aufgenommen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Stimulation von Flt3L-DC mit dsRNA40 ohne jegliche Hilfsmittel, mit dotapkomplexierter dsRNA40, mit dsRNA40-Chol und mit dsRNA40-Chol, welche durch 2'-O-Ribose-Methylierungen modifiziert war. Die alternierende 2'-O-Ribose-Methylierung wurde bereits zur Inhibition des immunstimulatorischen Potentials von siRNA beschrieben und wurde verwendet, um einen cholesterolinduzierten immunstimulatorischen Effekt auszuschließen [Hamm et al. 2010]. Des Weiteren wurden neben Wildtyp Flt3L-DC auch TLR7-defiziente Flt3L-DC differenziert und stimuliert, da TLR7 als Rezeptor für doppelsträngige siRNA beschrieben wurde [Hornung et al. 2005; Judge et al. 2005; Sioud 2005]. Durch die Stimulation der Wildtyp Flt3L-DC mit dsRNA40-Chol wurde eine starke Induktion der IFN $\alpha$ -Sekretion erzielt, welche im Vergleich zu dotapkomplexierter dsRNA40 wesentlich stärker ausfiel (Abbildung 4.25a). Außerdem induzierte dsRNA40-Chol die Sekretion der Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 sowie des Chemokins IP-10 (Abbildung 4.25a). Auch hier zeigte sich das deutlich stärkere immunstimulatorische Potential von dsRNA40-Chol im Vergleich zu dotapkomplexierter dsRNA40. Ohne Trägersubstanz zeigte dsRNA40 keine Immunstimulation. Die Einleitung einer Immunreaktion, welche durch Cholesterol induziert wird, konnte durch Verwendung von dsRNA40-Chol mit 2'-O-Ribose-Methylierung ausgeschlossen werden. Wie postuliert, erfolgte die Detektion von dsRNA40-Chol über TLR7 (Abbildung 4.25).

### 5.3 Ausblick

Durch die in dieser Arbeit dargelegten Daten und Erkenntnissen ergeben sich einige weitergehende Fragestellungen, welche zukünftig untersucht werden sollen. Der

folgende Abschnitt gibt einen Einblick in künftig zu erforschende Themenbereiche.

### 5.3.1 Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunantwort

Der Fokus künftiger Experimente liegt auf der Aufklärung des Mechanismus, durch welchen Mo-MuLV inhibierend auf die IFN $\alpha$ -Sekretion durch Flt3L-DC einwirkt. Dies ist besonders im Hinblick auf die weitere Analyse des Anteils von retroviralen RNA/DNA-Hybriden an der Induktion einer angeborenen Immunantwort von zentraler Bedeutung, da bisher kein geeignetes System für diese Untersuchungen zur Verfügung steht. Für nachfolgende Experimente sollen Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  defiziente Flt3L-DC untersucht werden. Für dieses Adaptermolekül wurde bereits ein inhibitorischer Einfluss auf die Interferonsignalkaskade beschrieben [Bao et al. 2013]. Die Identifizierung eines Oberflächenrezeptors oder eines Adaptermoleküls, welches inhibierend auf die Interferon-Sekretion wirkt, ermöglicht weitere Analysen. Unter Verwendung von defizienten Flt3L-DC kann das immunstimulatorische Potential von retroviralen RNA/DNA-Hybriden detaillierter untersucht werden. Des Weiteren könnten Retroviren mit mutierten Hüllproteinen verwendet werden, um neben dem zellulären Rezeptor bzw. Adapter den retroviralen Liganden zu beschreiben. Außerdem kann in diesem System herausgefunden werden, ob eine produktive Infektion der Flt3L-DC nötig ist, um die Inhibition des Interferonsignalweges auszulösen. In einem geeigneten System könnten schließlich weitere Analysen bezüglich der Zytokinausschüttung sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene getroffen werden. Außerdem wird die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und interferoninduzierbarer Proteine näher untersucht, da diese für die Einleitung einer adaptiven bzw. antiviralen Immunantwort essentiell sind.

Wie beschrieben kommt es während der retroviralen Infektion zur Ausbildung von RNA/DNA-Hybriden. Bisher wurde beschrieben, dass mit HIV-1 infizierte Patienten Akkumulationen von RNA/DNA-Hybriden in PBMC (vor allem in Lymphozyten) aufweisen. Es wird postuliert, dass die Reverse Transkriptase das RNA-Genom in ruhenden Zellen nur sehr langsam in DNA umschreiben kann, da die Anzahl der verfügbaren dNTP begrenzt ist und somit die Akkumulation der Hybride erfolgt [Kato S et al. 2002]. Bisher wurde nicht näher verifiziert, ob diese Ansammlungen von RNA/DNA-Hybriden zur Induktion einer antiviralen Immunantwort führen. Dieser Fragestellung sollte künftig nachgegangen werden, um physiologische RNA/DNA-Hybride als Liganden für TLR9 weiter zu charakterisieren.

RNA/DNA-Hybride treten auch während der Replikation von endogenen Re-

trotransposons auf. Retrotransposons kodieren unter anderem das Enzym Reverse Transkriptase, welche aus einem RNA-Transkript eine DNA-Kopie erzeugt. Diese DNA-Kopie wird wiederum an einer anderen Stelle in die chromosomale DNA eingebaut. Solche Retrotransposons sind in allen Zellen eines Organismus enthalten und werden vertikal über Keimbahnzellen übertragen. Bis zu 1 % des menschlichen Genoms besteht aus solchen transponierbaren DNA-Elementen. Unter bestimmten Umständen ist eine Aktivierung von Retrotransposons zur Produktion von exogenen infektiösen Partikeln möglich. Da für endogene Retroviren in einigen Mausstämmen bereits gezeigt werden konnte, dass ein enger Zusammenhang mit der Entstehung von Erkrankungen gegeben ist und die endosomalen TLR3, TLR7 und TLR9 eine zentrale Rolle für die Kontrolle von endogenen Retroviren spielen [Yu et al. 2012], ist es denkbar, dass auch in diesem Fall die Entstehung von RNA/DNA-Hybriden und deren Detektion von Bedeutung sind.

Das Hepatitis-B-Virus ist ein weiteres humanpathogenes Virus, welches mit Hilfe der Reversen Transkriptase eine prägenomische RNA in teilweise doppelsträngige DNA transkribiert und somit während des viralen Replikationszyklus RNA/DNA-Hybride bildet [Miller et al. 1984]. Auch im Falle des Hepatitis-B-Virus beginnt die Synthese des DNA-Gegenstranges wie bei den Retroviren an einer gegen die Degradation durch RNase H resistenten RNA-Sequenz. Des Weiteren ist eine TLR9-abhängige Detektion der genomischen DNA des Hepatitis-B-Virus beschrieben worden [Cui et al. 2010]. Der Einfluss des RNA/DNA-Hybrids wurde bisher im Bezug auf die eingeleitete Immunantwort nicht näher untersucht. Auch hier besteht weiterer Forschungsbedarf. Da das Hepatitis-B-Virus bereits einen Evasionsmechanismus entwickelt hat, um der antiviralen Immunantwort zu entgehen, muss auch im Falle dieser Infektion zunächst ein geeignetes Analysesystem gefunden werden. Die über TLR9-vermittelte Typ I Interferon-Sezernierung wird spezifisch durch das HBsAg (hepatitis surface antigen) in PBMC und pDC inhibiert [Y. Xu et al. 2009].

Die in dieser Dissertation nachgewiesene Detektion von RNA/DNA-Hybriden durch TLR9 sollte zukünftig auch im Bezug auf die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen näher analysiert werden. Da die Akkumulation endogener Nukleinsäurespezies die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen kann, ist ein Beitrag zur Ausbildung dieser Erkrankungen durch endogene RNA/DNA-Hybride wahrscheinlich. In der Literatur wurde beispielsweise für die Detektion von endogener DNA beschrieben, dass diese zur Pathogenese von systemischem Lupus erythematoses beiträgt [Napirei et al. 2000; Yasutomo et al. 2001].

Mutationen von TREX1, einer 3'-DNA-Exonuklease, welche im Normalfall DNA



von endogenen Retroelementen abbaut, führen zu letaler Autoimmunität, welche sowohl durch die erhöhte Sezernierung von Typ I Interferonen als auch durch erhöhte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst wird [Morita et al. 2004; Stetson et al. 2008]. TREX1-Mutationen stehen in direktem Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes und dem Aicardi-Goutières Syndrom [Crow et al. 2006a; Lee-Kirsch et al. 2007b].

Des Weiteren spielen Mutationen der RNase H im Zusammenhang mit Anreicherungen von RNA/DNA-Hybriden eine Rolle. Mutationen der RNase H begünstigen ebenfalls das Auftreten des Aicardi-Goutières Syndroms [Crow et al. 2006b]. Vermutlich stellen RNA/DNA-Hybride ein gemeinsames Substrat für TREX1 und RNase H dar, weshalb Mutationen dieser Enzyme die Akkumulation von RNA/DNA-Hybriden begünstigen [Bhoj et al. 2008; Stetson et al. 2008].

Das Enzym RNase H ist von essentieller Bedeutung, um die genomische Stabilität aufrechtzuerhalten [Hiller et al. 2012; Reijns et al. 2012]. Da Mäuse, welche für das Enzym RNase HII defizient sind, einen embryonal letalen Phänotyp aufweisen, wurde bereits im Rahmen dieser Dissertation analysiert, ob Mäuse, welche sowohl für das Enzym RNase HII als auch für TLR9 defizient sind, überleben. Diese Vermutung bestätigte sich allerdings nicht (Daten nicht gezeigt).

Von zukünftigem Interesse ist die Untersuchung von TREX1 und TLR9 doppeldefizienten Mäusen, um die Rolle von TLR9 im Zusammenhang mit dem Beginn oder dem Verlauf von Autoimmunerkrankungen zu analysieren.

### 5.3.2 Das Potential cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans

Aufgrund des außerordentlichen Potentials von dsRNA40-Chol zur Induktion einer angeborenen Immunantwort über TLR7 soll in zukünftigen Experimenten die Verwendbarkeit von dsRNA40-Chol als Adjuvans weiter untersucht werden.

Da TLR7 von B-Lymphozyten und pDC exprimiert wird, kann die dsRNA40-Chol-induzierte Aktivierung des Immunsystems sowohl zur Sezernierung von antigenspezifischen Antikörpern als auch zur Produktion von Zytokinen und somit zur Aktivierung von zellulären Immunantworten beitragen. Dazu muss das dsRNA40-Chol vermittelte Potential zur Zytokininduktion *in vivo* analysiert werden. Im nächsten Schritt soll daher dsRNA40-Chol als Adjuvans für die Immunisierung mit dem Modellantigen Ovalbumin eingesetzt werden und die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten untersucht werden.

Dieses auf einem cholesterolkonjugierten TLR7-Liganden basierende Adjuvans-

---

system besitzt den entscheidenden Vorteil, dass die zelluläre Aufnahme direkt durch Cholesterol, welches als natürlicher Baustein in Plasmamembranen vorkommt, vermittelt wird. Auf die Verwendung von synthetischen Transfektionsreagenzien kann verzichtet werden und damit einhergehende unerwünschte Nebenwirkungen können in diesem System ausgeschlossen werden.



---

# ZUSAMMENFASSUNG

---

## Die Rolle von RNA/DNA-Hybriden in der angeborenen Immunantwort

Das angeborene Immunsystem detektiert RNA und DNA über verschiedene pattern recognition receptors (PRR), zu welchen unter anderem die Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören.

RNA/DNA-Hybride treten im Verlauf viraler Infektionen, während endogener Prozesse sowie im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen auf. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass synthetische RNA/DNA-Hybride, welche als Bestandteil der Genome des humanen Zytomegalievirus (HCMV) und des humanen Immundefizienzvirus (HIV) vorkommen, sowohl in humanen peripheral blood mononuclear cells (PBMC) als auch in murinen Flt3L-differenzierten dendritischen Zellen (Flt3L-DC) eine durch die Sezernierung von  $\text{IFN}\alpha$  gekennzeichnete Immunantwort induzieren. Für das murine System wurde außerdem die Sezernierung weiterer Zytokine ( $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IP-10) nachgewiesen. Durch die Verwendung von TLR9-defizienten Flt3L-DC wurde TLR9 als Rezeptor für die Detektion von RNA/DNA-Hybriden identifiziert. Außerdem wurde die spezifische Bindung von RNA/DNA-Hybriden an TLR9 in einer Bindungsstudie verifiziert. Dass die Induktion der Immunantwort durch RNA/DNA-Hybride erfolgte wurde fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung eines RNA/DNA-Hybrid-spezifischen Antikörpers bestätigt.

Während der retroviralen Infektion von Flt3L-DC mit dem Moloney murinen Leukämievirus (Mo-MuLV) wurde die intrazelluläre Bildung und Akkumulation von RNA/DNA-Hybriden verifiziert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mo-MuLV einen inhibitorischen Einfluss auf die CpG2216-vermittelte Induktion der IFN-Signalkaskade in Flt3L-DC besitzt, welcher weder über den Oberflächenrezeptor Siglec-H noch über das Adaptermolekül DAP12 vermittelt wird.

Das TLR9-abhängige immunstimulatorische Potential synthetischer RNA/DNA-Hybriden konnte für virale, bakterielle oder mitochondriale Genome, welche natür-

licherweise vorkommende RNA/DNA-Hybrid-Strukturen beinhalten, nicht abschließend analysiert werden, da der wesentlich höhere Gehalt an immunstimulatorischer genomischer DNA zu einer Überlagerung des RNA/DNA-Hybrid-induzierten Einflusses führte.

Schlüsselwörter: RNA/DNA-Hybride, TLR9, angeborene Immunität, virale/retrovirale Infektion

## Das Potential von cholesterolkonjugierter RNA40 als Adjuvans

Zur Prävention von Infektionskrankheiten ist die Entwicklung von Impfstoffen von großer Bedeutung. Adjuvantien werden als Bestandteil von Impfstoffen eingesetzt und verstärken die durch den Impfstoff induzierte Immunantwort.

Sowohl natürliche als auch synthetische TLR-Liganden besitzen das Potential als Adjuvantien verwendet zu werden. Da die unterschiedlichen TLR zelltypspezifisch exprimiert und durch ihre Liganden verschiedene Zytokinprofile induziert werden, kann eine eingeleitete Immunantwort durch TLR-Liganden modelliert werden. Solche Adjuvantien dürfen keine unerwünschten Nebenwirkungen besitzen.

RNA40, eine Sequenz aus dem HIV-Genom, wurde bereits als TLR7-Ligand beschrieben. Derzeit müssen jedoch Transfektionsreagenzien verwendet werden, um sowohl die zelluläre Aufnahme des TLR-Liganden zu forcieren als auch die Stabilität der Nukleinsäuren zu gewährleisten. Da Transfektionsreagenzien zelltoxische Eigenschaften besitzen, sind sie für die Zulassung als Adjuvans von humanen Impfstoffen problematisch.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass cholesterolkonjugierte dsRNA40 (dsRNA40-Chol) ohne zusätzliche Komplexierung mit einem synthetischen Transfektionsreagenz ein außerordentliches immunstimulatorisches Potential besitzt, welches sich in der Sezernierung von  $\text{IFN}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6 und IP-10 durch murine Flt3L-DC äußerte. Die durch dsRNA40-Chol eingeleitete Immunreaktion war im Vergleich zu der durch dotapkomplexierte dsRNA40 induzierten deutlich stärker. Die Detektion von dsRNA40-Chol erfolgte, wie erwartet, durch TLR7. Die zelluläre Aufnahme von dsRNA40-Chol wurde durchflusszytometrisch verifiziert und war der Transfektion von dsRNA40 im Komplex mit Dotap gleichwertig.

Schlüsselwörter: RNA40, Cholesterol, Adjuvans, TLR7

---

## SUMMARY

---

### RNA/DNA-hybrids in innate immunity

The innate immune system senses viral and bacterial nucleic acids in the cytoplasm or in endosomal compartments via different pattern recognition receptors (PRR) such as Toll-like receptors (TLR). The repertoire of pathogen-associated molecular patterns (PAMP) is still not exhausted. Since RNA/DNA-hybrids are formed transiently during viral infection, cell endogenous processes and may lead to autoimmune diseases, the immunostimulatory capacity of RNA/DNA-hybrids needs to be further investigated.

Analysis of HCMV- and HIV-derived synthetic RNA/DNA-hybrids showed an efficient induction of IFN $\alpha$ -secretion in human PBMC as well as in murine Flt3L-DC. Additionally, murine Flt3L-DC produced TNF $\alpha$ , IL-6 and IP-10 upon RNA/DNA-hybrid stimulation. Cytokine induction occurred in a TLR9-dependent manner since TLR9-deficient Flt3L-DC did not respond with cytokine production to RNA/DNA-hybrids. Direct interaction of RNA/DNA-hybrids with TLR9 was demonstrated by an ELISA-based binding assay. Furthermore, intact RNA/DNA-hybrids could be detected within transfected Flt3L-DC with the RNA/DNA-hybrid-specific antibody S9.6.

The influence of RNA/DNA-hybrids within viral, bacterial or mitochondrial genomes could not be analysed in detail, because their immunostimulatory potential was probably masked by high amounts of genomic DNA.

Infection of Flt3L-DC with Mo-MuLV lead to RNA/DNA-hybrid formation and accumulation within the cells cytoplasm and in vesicular structures. However, Mo-MuLV negatively influenced CpG2216-mediated IFN-signalling independent of Siglec-H or DAP12 in Flt3L-DC and therefore avoided antiviral immune responses.

Keywords: RNA/DNA-hybrids, TLR9, innate immunity, viral/retroviral infection

## Cholesterol-coupled dsRNA40 serves as a potent adjuvant delivery system

Vaccination is indispensable to prevent infectious diseases and therefore development of safe and potent vaccine adjuvants is still highly important. Adjuvants are included in vaccines to enhance immune responses to an antigen.

In general, TLR-ligands possess the potential to be utilized as adjuvants. Different TLR are expressed within diverse subtypes of immune cells and induce various cytokines. The cytokine milieu mainly influences the characteristics of an vaccine.

RNA40, which is a well established HIV-derived TLR7-ligand, has to be complexed to a transfection reagent for cellular uptake and for preventing enzymatic degradation. In this study a very potent adjuvant delivery system for TLR7 has been developed. Double-stranded RNA40 was coupled to cholesterol to force cellular uptake. Cholesterol occurs naturally within cell membranes for which reason undesired side-effect should be prevented.

Cellular uptake of cholesterol coupled dsRNA40 by Flt3L-DC was analyzed by flow cytometry and was as effective as uptake of dsRNA40 complexed to Dotap. Interestingly, stimulation of Flt3L-DC with dsRNA40 coupled to cholesterol lead to an increased secretion of IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in comparison to complexation of dsRNA40 to Dotap. Immune stimulation by cholesterol itself could be excluded. Overall, these *in vitro* experiments showed an effective activation of murine Flt3L-DC by dsRNA40-Chol in a TLR7-dependent manner.

Keywords: RNA40, cholesterol, adjuvants, TLR7

---

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abdelsadik, A. und Trad, A. (2011). „Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity.“ eng. In: *Hum Immunol* 72.12, S. 1188–1193.
- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A. und Hornung, V. (2009). „RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate.“ eng. In: *Nat Immunol* 10.10, S. 1065–1072.
- Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Röhl, I., Hopfner, K.-P., Ludwig, J. und Hornung, V. (2013). „cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING.“ eng. In: *Nature* 498.7454, S. 380–384.
- Akira, S. (2009). „Pathogen recognition by innate immunity and its signaling.“ eng. In: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85.4, S. 143–156.
- Akira, S. und Takeda, K. (2004). „Toll-like receptor signalling.“ eng. In: *Nat Rev Immunol* 4.7, S. 499–511.
- Alarcón-Riquelme, M. E. (2006). „Nucleic acid by-products and chronic inflammation.“ eng. In: *Nat Genet* 38.8, S. 866–867.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. und Flavell, R. A. (2001). „Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.“ eng. In: *Nature* 413.6857, S. 732–738.
- Anders, D. G., Kacica, M. A., Pari, G. und Punturieri, S. M. (1992). „Boundaries and structure of human cytomegalovirus oriLyt, a complex origin for lytic-phase DNA replication.“ eng. In: *J Virol* 66.6, S. 3373–3384.
- Anderson, K. V., Jürgens, G. und Nüsslein-Volhard, C. (1985). „Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product.“ eng. In: *Cell* 42.3, S. 779–789.
- Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H.-J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D. T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P. und Takayanagi, H. (2008). „Cathepsin K-

- dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis.“ eng. In: *Science* 319.5863, S. 624–627.
- Ashman, R. F., Goeken, J. A., Latz, E. und Lenert, P. (2011). „Optimal oligonucleotide sequences for TLR9 inhibitory activity in human cells: lack of correlation with TLR9 binding.“ eng. In: *Int Immunol* 23.3, S. 203–214.
- Balachandran, S. und Barber, G. N. (2007). „PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis.“ eng. In: *Methods Mol Biol* 383, S. 277–301.
- Baltimore, D. (1970). „RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses.“ eng. In: *Nature* 226.5252, S. 1209–1211.
- Bao, M. und Liu, Y.-J. (2013). „Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells.“ eng. In: *Protein Cell* 4.1, S. 40–52.
- Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L. und Barton, G. M. (2011). „Nucleic acid recognition by the innate immune system.“ eng. In: *Annu Rev Immunol* 29, S. 185–214.
- Bauer, S. (2013). „Toll-like receptor 9 processing: The key event in Toll-like receptor 9 activation?“ eng. In: *Immunol Lett* 149.1-2, S. 85–87.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Häcker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. und Lipford, G. B. (2001). „Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.16, S. 9237–9242.
- Bauer, S., Pigisch, S., Hangel, D., Kaufmann, A. und Hamm, S. (2008). „Recognition of nucleic acid and nucleic acid analogs by Toll-like receptors 7, 8 and 9.“ eng. In: *Immunobiology* 213.3-4, S. 315–328.
- Behr, J. P., Demeneix, B., Loeffler, J. P. und Perez-Mutul, J. (1989). „Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86.18, S. 6982–6986.
- Beignon, A.-S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D. und Bhardwaj, N. (2005). „Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions.“ eng. In: *J Clin Invest* 115.11, S. 3265–3275.
- Bhoj, V. G. und Chen, Z. J. (2008). „Linking retroelements to autoimmunity.“ eng. In: *Cell* 134.4, S. 569–571.
- Blasius, A. L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T. und Colonna, M. (2006). „Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12.“ eng. In: *Blood* 107.6, S. 2474–2476.

- Bochud, P.-Y., Hersberger, M., Taffé, P., Bochud, M., Stein, C. M., Rodrigues, S. D., Calandra, T., Francioli, P., Telenti, A., Speck, R. F., Aderem, A. und Study, S. H. I. V. C. (2007). „Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection.“ eng. In: *AIDS* 21.4, S. 441–446.
- Boulé, M. W., Broughton, C., Mackay, F., Akira, S., Marshak-Rothstein, A. und Rifkin, I. R. (2004). „Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes.“ eng. In: *J Exp Med* 199.12, S. 1631–1640.
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L. und Maliszewski, C. R. (2000). „Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures.“ eng. In: *Blood* 96.9, S. 3029–3039.
- Capaccioli, S., Di Pasquale, G., Mini, E., Mazzei, T. und Quattrone, A. (1993). „Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum.“ eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 197.2, S. 818–825.
- Chang, D. D. und Clayton, D. A. (1987). „A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA.“ eng. In: *Science* 235.4793, S. 1178–1184.
- Chang, D. D. und Clayton, D. A. (1989). „Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate.“ eng. In: *Cell* 56.1, S. 131–139.
- Cianciolo, G. J., Copeland, T. D., Oroszlan, S. und Snyderman, R. (1985). „Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins.“ eng. In: *Science* 230.4724, S. 453–455.
- Clayton, D. A. (2000). „Transcription and replication of mitochondrial DNA.“ eng. In: *Hum Reprod* 15 Suppl 2, S. 11–17.
- Clemens, M. J. und Elia, A. (1997). „The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function.“ eng. In: *J Interferon Cytokine Res* 17.9, S. 503–524.
- Colletti, K. S., Smallenburg, K. E., Xu, Y. und Pari, G. S. (2007). „Human cytomegalovirus UL84 interacts with an RNA stem-loop sequence found within the RNA/DNA hybrid region of oriLyt.“ eng. In: *J Virol* 81.13, S. 7077–7085.
- Collins, L. V., Hajizadeh, S., Holme, E., Jonsson, I.-M. und Tarkowski, A. (2004). „Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses.“ eng. In: *J Leukoc Biol* 75.6, S. 995–1000.



- Cornélie, S., Hoebeke, J., Schacht, A.-M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M. und Riveau, G. (2004). „Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition.“ eng. In: *J Biol Chem* 279.15, S. 15124–15129.
- Cossarizza, A., Pinti, M., Nasi, M., Gibellini, L., Manzini, S., Roat, E., De Biasi, S., Bertoncelli, L., Montagna, J. P., Bisi, L., Manzini, L., Trenti, T., Borghi, V. und Mussini, C. (2011). „Increased plasma levels of extracellular mitochondrial DNA during HIV infection: a new role for mitochondrial damage-associated molecular patterns during inflammation.“ eng. In: *Mitochondrion* 11.5, S. 750–755.
- Crow, Y. J., Hayward, B. E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D. N., van Bokhoven, H., Brunner, H. G., Hamel, B. C., Corry, P. C., Cowan, F. M., Frints, S. G., Klepper, J., Livingston, J. H., Lynch, S. A., Massey, R. F., Meritet, J. F., Michaud, J. L., Ponsot, G. et al. (2006a). „Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus.“ eng. In: *Nat Genet* 38.8, S. 917–920.
- Crow, Y. J., Leitch, A., Hayward, B. E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., Baumann, C., Baxter, P., Bertini, E., Chandler, K. E., Chitayat, D., Cau, D., Déry, C., Fazzi, E., Goizet, C., King, M. D. et al. (2006b). „Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection.“ eng. In: *Nat Genet* 38.8, S. 910–916.
- Crow, Y. J. und Rehwinkel, J. (2009). „Aicardi-Goutieres syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity.“ eng. In: *Hum Mol Genet* 18.R2, R130–R136.
- Cui, G.-Y. und Diao, H.-Y. (2010). „Recognition of HBV antigens and HBV DNA by dendritic cells.“ eng. In: *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 9.6, S. 584–592.
- Dalpke, A., Frank, J., Peter, M. und Heeg, K. (2006). „Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species.“ eng. In: *Infect Immun* 74.2, S. 940–946.
- Denner, J., Eschricht, M., Lauck, M., Semaan, M., Schlaermann, P., Ryu, H. und Akyüz, L. (2013). „Modulation of cytokine release and gene expression by the immunosuppressive domain of gp41 of HIV-1.“ eng. In: *PLoS One* 8.1, e55199.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. und Reis e Sousa, C. (2004). „Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.“ eng. In: *Science* 303.5663, S. 1529–1531.



- Doitsh, G., Cavrois, M., Lassen, K. G., Zepeda, O., Yang, Z., Santiago, M. L., Hebbeler, A. M. und Greene, W. C. (2010). „Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue.“ eng. In: *Cell* 143.5, S. 789–801.
- Elouahabi, A. und Ruysschaert, J.-M. (2005). „Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes.“ eng. In: *Mol Ther* 11.3, S. 336–347.
- Eng, N. F., Bhardwaj, N., Mulligan, R. und Diaz-Mitoma, F. (2013). „The potential of 1018 ISS adjuvant in hepatitis B vaccines: HEPLISAV™ review.“ eng. In: *Hum Vaccin Immunother* 9.8, S. 1661–1672.
- Erlwein, O., Buchholz, C. J. und Schnierle, B. S. (2003). „The proline-rich region of the ecotropic Moloney murine leukaemia virus envelope protein tolerates the insertion of the green fluorescent protein and allows the generation of replication-competent virus.“ eng. In: *J Gen Virol* 84.Pt 2, S. 369–373.
- Ewald, S. E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogyo, M. und Barton, G. M. (2011). „Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase.“ eng. In: *J Exp Med* 208.4, S. 643–651.
- Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G.-P., Chapman, H. A. und Barton, G. M. (2008). „The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor.“ eng. In: *Nature* 456.7222, S. 658–662.
- Farrell, P. J., Balkow, K., Hunt, T., Jackson, R. J. und Trachsel, H. (1977). „Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis.“ eng. In: *Cell* 11.1, S. 187–200.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. und Danielsen, M. (1987). „Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84.21, S. 7413–7417.
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J. und Alnemri, E. S. (2009). „AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA.“ eng. In: *Nature* 458.7237, S. 509–513.
- Fitzgerald, M. E. und Drohat, A. C. (2008). „Structural studies of RNA/DNA polypurine tracts.“ eng. In: *Chem Biol* 15.3, S. 203–204.
- Freguja, R., Ganesin, K., Del Bianco, P., Malacrida, S., Rampon, O., Zanchetta, M., Giaquinto, C. und De Rossi, A. (2012). „Polymorphisms of innate immunity genes influence disease progression in HIV-1-infected children.“ eng. In: *AIDS* 26.6, S. 765–768.

- Ganten, D. und Ruckpaul, K. (2003). *Grundlagen Der Molekularen Medizin*. Springer Verlag.
- Gao, P., Ascano, M., Wu, Y., Barchet, W., Gaffney, B. L., Zillinger, T., Serganov, A. A., Liu, Y., Jones, R. A., Hartmann, G., Tuschl, T. und Patel, D. J. (2013). „Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase.“ eng. In: *Cell* 153.5, S. 1094–1107.
- Gao, X. und Huang, L. (1991). „A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells.“ eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 179.1, S. 280–285.
- Ghimire, T. R., Benson, R. A., Garside, P. und Brewer, J. M. (2012). „Alum increases antigen uptake, reduces antigen degradation and sustains antigen presentation by DCs in vitro.“ eng. In: *Immunol Lett* 147.1-2, S. 55–62.
- Guernonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. und Amigorena, S. (2002). „Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells.“ eng. In: *Annu Rev Immunol* 20, S. 621–667.
- Guiducci, C., Ott, G., Chan, J. H., Damon, E., Calacsan, C., Matray, T., Lee, K.-D., Coffman, R. L. und Barrat, F. J. (2006). „Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation.“ eng. In: *J Exp Med* 203.8, S. 1999–2008.
- Gupta, A. K., Cherman, A. M. und Tyring, S. K. (2004). „Viral and nonviral uses of imiquimod: a review.“ eng. In: *J Cutan Med Surg* 8.5, S. 338–352.
- Gürtler, C. und Bowie, A. G. (2013). „Innate immune detection of microbial nucleic acids.“ eng. In: *Trends Microbiol* 21.8, S. 413–420.
- Haas, T., Metzger, J., Schmitz, F., Heit, A., Müller, T., Latz, E. und Wagner, H. (2008). „The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation.“ eng. In: *Immunity* 28.3, S. 315–323.
- Halperin, S. A., Dobson, S., McNeil, S., Langley, J. M., Smith, B., McCall-Sani, R., Levitt, D., Nest, G. V., Gennevois, D. und Eiden, J. J. (2006). „Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults.“ eng. In: *Vaccine* 24.1, S. 20–26.
- Hamm, S., Heit, A., Koffler, M., Huster, K. M., Akira, S., Busch, D. H., Wagner, H. und Bauer, S. (2007). „Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response in vivo.“ eng. In: *Int Immunol* 19.3, S. 297–304.

- Hamm, S., Latz, E., Hangel, D., Müller, T., Yu, P., Golenbock, D., Sparwasser, T., Wagner, H. und Bauer, S. (2010). „Alternating 2'-O-ribose methylation is a universal approach for generating non-stimulatory siRNA by acting as TLR7 antagonist.“ eng. In: *Immunobiology* 215.7, S. 559–569.
- Hansen, J. D., Vojtech, L. N. und Laing, K. J. (2011). „Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins.“ eng. In: *Dev Comp Immunol* 35.9, S. 886–897.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. und Bates, E. E. M. (2005). „Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88.“ eng. In: *J Immunol* 174.5, S. 2942–2950.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004). „Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.“ eng. In: *Science* 303.5663, S. 1526–1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. und Akira, S. (2000). „A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA.“ eng. In: *Nature* 408.6813, S. 740–745.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. und Akira, S. (2002). „Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.“ eng. In: *Nat Immunol* 3.2, S. 196–200.
- Hiller, B., Achleitner, M., Glage, S., Naumann, R., Behrendt, R. und Roers, A. (2012). „Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity.“ eng. In: *J Exp Med* 209.8, S. 1419–1426.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C. und Taniguchi, T. (2005a). „Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction.“ eng. In: *Nature* 434.7036, S. 1035–1040.
- Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. und Taniguchi, T. (2005b). „IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses.“ eng. In: *Nature* 434.7034, S. 772–777.
- Horng, T., Barton, G. M. und Medzhitov, R. (2001). „TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway.“ eng. In: *Nat Immunol* 2.9, S. 835–841.

- Hornung, V., Ablasser, A., Charrel-Dennis, M., Bauernfeind, F., Horvath, G., Caffrey, D. R., Latz, E. und Fitzgerald, K. A. (2009). „AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC.“ eng. In: *Nature* 458.7237, S. 514–518.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S. und Hartmann, G. (2006). „5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.“ eng. In: *Science* 314.5801, S. 994–997.
- Hornung, V., Guenthner-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S. und Hartmann, G. (2005). „Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7.“ eng. In: *Nat Med* 11.3, S. 263–270.
- Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C. und Akira, S. (2008). „TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines.“ eng. In: *Nature* 451.7179, S. 725–729.
- Ishikawa, H., Ma, Z. und Barber, G. N. (2009). „STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity.“ eng. In: *Nature* 461.7265, S. 788–792.
- Itaya, M., Omori, A., Kanaya, S., Crouch, R. J., Tanaka, T. und Kondo, K. (1999). „Isolation of RNase H genes that are essential for growth of *Bacillus subtilis* 168.“ eng. In: *J Bacteriol* 181.7, S. 2118–2123.
- Jackson, K. J. L., Kidd, M. J., Wang, Y. und Collins, A. M. (2013). „The Shape of the Lymphocyte Receptor Repertoire: Lessons from the B Cell Receptor.“ eng. In: *Front Immunol* 4, S. 263.
- Janeway Jr, C. A. und Medzhitov, R. (2002). „Innate immune recognition.“ eng. In: *Annu Rev Immunol* 20, S. 197–216.
- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K. und MacLachlan, I. (2005). „Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA.“ eng. In: *Nat Biotechnol* 23.4, S. 457–462.
- Kagan, J. C. (2012). „Signaling organelles of the innate immune system.“ eng. In: *Cell* 151.6, S. 1168–1178.
- Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. und Weissman, D. (2004). „mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3.“ eng. In: *J Biol Chem* 279.13, S. 12542–12550.

- Kato S, T., Saito, Y., Tanaka, R. und Hanabusa, H. (2002). „HIV-1 RNA-DNA hybrid in peripheral blood mononuclear cells of infected individuals.“ In: *International Conference on AIDS*.
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T. und Akira, S. (2008). „Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5.“ eng. In: *J Exp Med* 205.7, S. 1601–1610.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. und Akira, S. (2006). „Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses.“ eng. In: *Nature* 441.7089, S. 101–105.
- Kawai, T. und Akira, S. (2009). „The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.“ eng. In: *Int Immunol* 21.4, S. 317–337.
- Kawai, T. und Akira, S. (2010). „The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.“ eng. In: *Nat Immunol* 11.5, S. 373–384.
- Kawai, T. und Akira, S. (2011). „Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity.“ eng. In: *Immunity* 34.5, S. 637–650.
- Kim, Y.-M., Brinkmann, M. M., Paquet, M.-E. und Ploegh, H. L. (2008). „UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes.“ eng. In: *Nature* 452.7184, S. 234–238.
- Kindrachuk, J., Potter, J. E., Brownlie, R., Ficzy, A. D., Griebel, P. J., Mookherjee, N., Mutwiri, G. K., Babiuk, L. A. und Napper, S. (2007). „Nucleic acids exert a sequence-independent cooperative effect on sequence-dependent activation of Toll-like receptor 9.“ eng. In: *J Biol Chem* 282.19, S. 13944–13953.
- Koblansky, A. A., Jankovic, D., Oh, H., Hieny, S., Sungnak, W., Mathur, R., Hayden, M. S., Akira, S., Sher, A. und Ghosh, S. (2013). „Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*.“ eng. In: *Immunity* 38.1, S. 119–130.
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A. A., Dzionic, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M. und Colonna, M. (2004). „TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function.“ eng. In: *Immunity* 21.1, S. 107–119.

- Kuenzel, S., Till, A., Winkler, M., Häsler, R., Lipinski, S., Jung, S., Grötzinger, J., Fickenscher, H., Schreiber, S. und Rosenstiel, P. (2010). „The nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor NLRC5 is involved in IFN-dependent anti-viral immune responses.“ eng. In: *J Immunol* 184.4, S. 1990–2000.
- Kumar, H., Kawai, T. und Akira, S. (2011). „Pathogen recognition by the innate immune system.“ eng. In: *Int Rev Immunol* 30.1, S. 16–34.
- Kumar, M. und Carmichael, G. G. (1998). „Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes.“ eng. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62.4, S. 1415–1434.
- Lande, R. und Gilliet, M. (2010). „Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses.“ eng. In: *Ann N Y Acad Sci* 1183, S. 89–103.
- Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T. und Golenbock, D. T. (2004). „TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome.“ eng. In: *Nat Immunol* 5.2, S. 190–198.
- Leber, J. H., Crimmins, G. T., Raghavan, S., Meyer-Morse, N. P., Cox, J. S. und Portnoy, D. A. (2008). „Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen.“ eng. In: *PLoS Pathog* 4.1, e6.
- Lee, D. Y. und Clayton, D. A. (1997). „RNase mitochondrial RNA processing correctly cleaves a novel R loop at the mitochondrial DNA leading-strand origin of replication.“ eng. In: *Genes Dev* 11.5, S. 582–592.
- Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N. und Iwasaki, A. (2007). „Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells.“ eng. In: *Science* 315.5817, S. 1398–1401.
- Lee, M. S. und Kim, Y.-J. (2007). „Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk.“ eng. In: *Annu Rev Biochem* 76, S. 447–480.
- Lee-Kirsch, M. A., Chowdhury, D., Harvey, S., Gong, M., Senenko, L., Engel, K., Pfeiffer, C., Hollis, T., Gahr, M., Perrino, F. W., Lieberman, J. und Hubner, N. (2007a). „A mutation in TREX1 that impairs susceptibility to granzyme A-mediated cell death underlies familial chilblain lupus.“ eng. In: *J Mol Med (Berl)* 85.5, S. 531–537.
- Lee-Kirsch, M. A., Gong, M., Chowdhury, D., Senenko, L., Engel, K., Lee, Y.-A., de Silva, U., Bailey, S. L., Witte, T., Vyse, T. J., Kere, J., Pfeiffer, C., Harvey, S., Wong, A., Koskenmies, S., Hummel, O., Rohde, K., Schmidt, R. E., Dominiczak,



- A. F., Gahr, M. et al. (2007b). „Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus.“ eng. In: *Nat Genet* 39.9, S. 1065–1067.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996). „The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.“ eng. In: *Cell* 86.6, S. 973–983.
- Leventis, R. und Silvius, J. R. (1990). „Interactions of mammalian cells with lipid dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1023.1, S. 124–132.
- Li, Y., Berke, I. C. und Modis, Y. (2012). „DNA binding to proteolytically activated TLR9 is sequence-independent and enhanced by DNA curvature.“ eng. In: *EMBO J* 31.4, S. 919–931.
- Liberatore, R. A. und Bieniasz, P. D. (2011). „Tetherin is a key effector of the antiretroviral activity of type I interferon in vitro and in vivo.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108.44, S. 18097–18101.
- Mandl, J. N., Barry, A. P., Vanderford, T. H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Staprans, S. I. und Feinberg, M. B. (2008). „Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections.“ eng. In: *Nat Med* 14.10, S. 1077–1087.
- Mangeney, M., de Parseval, N., Thomas, G. und Heidmann, T. (2001). „The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties.“ eng. In: *J Gen Virol* 82.Pt 10, S. 2515–2518.
- Mangeney, M. und Heidmann, T. (1998). „Tumor cells expressing a retroviral envelope escape immune rejection in vivo.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95.25, S. 14920–14925.
- Marsili, G., Remoli, A. L., Sgarbanti, M., Perrotti, E., Fragale, A. und Battistini, A. (2012). „HIV-1, interferon and the interferon regulatory factor system: an interplay between induction, antiviral responses and viral evasion.“ eng. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 23.4-5, S. 255–270.
- Matsumoto, F., Saitoh, S.-I., Fukui, R., Kobayashi, T., Tanimura, N., Konno, K., Kusumoto, Y., Akashi-Takamura, S. und Miyake, K. (2008). „Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses.“ eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 367.3, S. 693–699.
- McKee, A. S., Burchill, M. A., Munks, M. W., Jin, L., Kappler, J. W., Friedman, R. S., Jacobelli, J. und Marrack, P. (2013). „Host DNA released in response to

- aluminum adjuvant enhances MHC class II-mediated antigen presentation and prolongs CD4 T-cell interactions with dendritic cells.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 110.12, E1122–E1131.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway Jr, C. (1997). „A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.“ eng. In: *Nature* 388.6640, S. 394–397.
- Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H.-J., Hellman, J., van Lunzen, J. und Altfeld, M. (2007). „MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands.“ eng. In: *J Virol* 81.15, S. 8180–8191.
- Miller, R. H., Marion, P. L. und Robinson, W. S. (1984). „Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction.“ eng. In: *Virology* 139.1, S. 64–72.
- Mizuta, R., Iwai, K., Shigeno, M., Mizuta, M., Uemura, T., Ushiki, T. und Kitamura, D. (2003). „Molecular visualization of immunoglobulin switch region RNA/DNA complex by atomic force microscope.“ eng. In: *J Biol Chem* 278.7, S. 4431–4434.
- Modrow S., D. F. (2010). *Molekulare Virologie*. Bd. 3. Spektrum Akademischer Verlag.
- Morita, M., Stamp, G., Robins, P., Dulic, A., Rosewell, I., Hrivnak, G., Daly, G., Lindahl, T. und Barnes, D. E. (2004). „Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis.“ eng. In: *Mol Cell Biol* 24.15, S. 6719–6727.
- Murphy, K. (2011). *Janeway's Immunobiology*. Garland Science Taylor & Francis Group.
- Napirei, M., Karsunky, H., Zevnik, B., Stephan, H., Mannherz, H. G. und Möröy, T. (2000). „Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice.“ eng. In: *Nat Genet* 25.2, S. 177–181.
- Neerincx, A., Lautz, K., Menning, M., Kremmer, E., Zigrino, P., Hösel, M., Büning, H., Schwarzenbacher, R. und Kufer, T. A. (2010). „A role for the human nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat-containing family member NLRC5 in antiviral responses.“ eng. In: *J Biol Chem* 285.34, S. 26223–26232.
- Nguyen, D. N., Mahon, K. P., Chikh, G., Kim, P., Chung, H., Vicari, A. P., Love, K. T., Goldberg, M., Chen, S., Krieg, A. M., Chen, J., Langer, R. und Anderson, D. G. (2012). „Lipid-derived nanoparticles for immunostimulatory RNA adjuvant delivery.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109.14, E797–E803.



- Nohynek, H., Jokinen, J., Partinen, M., Vaarala, O., Kirjavainen, T., Sundman, J., Himanen, S.-L., Hublin, C., Julkunen, I., Olsén, P., Saarenpää-Heikkilä, O. und Kilpi, T. (2012). „AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland.“ eng. In: *PLoS One* 7.3, e33536.
- Nomura, N., Miyajima, N., Sazuka, T., Tanaka, A., Kawarabayasi, Y., Sato, S., Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K. und Tabata, S. (1994). „Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1.“ eng. In: *DNA Res* 1.1, S. 27–35.
- Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., Akira, S., Yamamoto, A., Komuro, I. und Otsu, K. (2012). „Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure.“ eng. In: *Nature* 485.7397, S. 251–255.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., Bathke, B., Lauterbach, H., Suter, M., Dreher, S., Koedel, U., Akira, S., Kawai, T., Buer, J., Wagner, H., Bauer, S., Hochrein, H. und Kirschning, C. J. (2012). „TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification.“ eng. In: *Science* 337.6098, S. 1111–1115.
- Onji, M., Kanno, A., Saitoh, S.-I., Fukui, R., Motoi, Y., Shibata, T., Matsumoto, F., Lamichhane, A., Sato, S., Kiyono, H., Yamamoto, K. und Miyake, K. (2013). „An essential role for the N-terminal fragment of Toll-like receptor 9 in DNA sensing.“ eng. In: *Nat Commun* 4, S. 1949.
- Palm, N. W. und Medzhitov, R. (2009). „Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity.“ eng. In: *Immunol Rev* 227.1, S. 221–233.
- Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y.-M. und Ploegh, H. L. (2008). „Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9.“ eng. In: *Nat Immunol* 9.12, S. 1407–1414.
- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T. und Golenbock, D. T. (2007). „Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 104.6, S. 1919–1924.
- Partinen, M., Saarenpää-Heikkilä, O., Ilveskoski, I., Hublin, C., Linna, M., Olsén, P., Nokelainen, P., Alén, R., Wallden, T., Espo, M., Rusanen, H., Olme, J.,

- Sättilä, H., Arikka, H., Kaipainen, P., Julkunen, I. und Kirjavainen, T. (2012). „Increased incidence and clinical picture of childhood narcolepsy following the 2009 H1N1 pandemic vaccination campaign in Finland.“ eng. In: *PLoS One* 7.3, e33723.
- Phillips, C. J., Matyas, G. R., Hansen, C. J., Alving, C. R., Smith, T. C. und Ryan, M. A. K. (2009). „Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness.“ eng. In: *Vaccine* 27.29, S. 3921–3926.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Näslund, T. I., Liljeström, P., Weber, F. und Reis e Sousa, C. (2006). „RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates.“ eng. In: *Science* 314.5801, S. 997–1001.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.-P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G. und Reis e Sousa, C. (2009). „Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection.“ eng. In: *J Virol* 83.20, S. 10761–10769.
- Pillai, S., Netravali, I. A., Cariappa, A. und Mattoo, H. (2012). „Siglecs and immune regulation.“ eng. In: *Annu Rev Immunol* 30, S. 357–392.
- Pires, P., Simões, S., Nir, S., Gaspar, R., Düzgünes, N. und Pedroso de Lima, M. C. (1999). „Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells.“ eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1418.1, S. 71–84.
- Poland, J. D., Calisher, C. H., Monath, T. P., Downs, W. G. und Murphy, K. (1981). „Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine.“ eng. In: *Bull World Health Organ* 59.6, S. 895–900.
- Powell, M. D. und Levin, J. G. (1996). „Sequence and structural determinants required for priming of plus-strand DNA synthesis by the human immunodeficiency virus type 1 polypurine tract.“ eng. In: *J Virol* 70.8, S. 5288–5296.
- Prichard, M. N., Jairath, S., Penfold, M. E., St Jeor, S., Bohlman, M. C. und Pari, G. S. (1998). „Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus.“ eng. In: *J Virol* 72.9, S. 6997–7004.
- Querec, T., Bennouna, S., Alkan, S., Laouar, Y., Gorden, K., Flavell, R., Akira, S., Ahmed, R. und Pulendran, B. (2006). „Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity.“ eng. In: *J Exp Med* 203.2, S. 413–424.
- Rausch, J. W. und Le Grice, S. F. J. (2004). „'Binding, bending and bonding': polypurine tract-primed initiation of plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus.“ eng. In: *Int J Biochem Cell Biol* 36.9, S. 1752–1766.

- Reijns, M. A. M., Rabe, B., Rigby, R. E., Mill, P., Astell, K. R., Lettice, L. A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., Devenney, P. S., Sexton, D., Grimes, G., Holt, I. J., Hill, R. E., Taylor, M. S., Lawson, K. A., Dorin, J. R. und Jackson, A. P. (2012). „Enzymatic removal of ribonucleotides from DNA is essential for mammalian genome integrity and development.“ eng. In: *Cell* 149.5, S. 1008–1022.
- Rennekamp, A. J. und Lieberman, P. M. (2011). „Initiation of Epstein-Barr virus lytic replication requires transcription and the formation of a stable RNA-DNA hybrid molecule at OriLyt.“ eng. In: *J Virol* 85.6, S. 2837–2850.
- Ricci, E., Malacrida, S., Zanchetta, M., Mosconi, I., Montagna, M., Giaquinto, C. und De Rossi, A. (2010). „Toll-like receptor 9 polymorphisms influence mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1.“ eng. In: *J Transl Med* 8, S. 49.
- Rigby, R. E., Leitch, A. und Jackson, A. P. (2008). „Nucleic acid-mediated inflammatory diseases.“ eng. In: *Bioessays* 30.9, S. 833–842.
- Rigby, R. E., Webb, L. M., Mackenzie, K. J., Li, Y., Leitch, A., Reijns, M. A. M., Lundie, R. J., Revuelta, A., Davidson, D. J., Diebold, S., Modis, Y., Macdonald, A. S. und Jackson, A. P. (2014). „RNA:DNA hybrids are a novel molecular pattern sensed by TLR9.“ eng. In: *EMBO J* 33.6, S. 542–558.
- Roberts, T. L., Idris, A., Dunn, J. A., Kelly, G. M., Burnton, C. M., Hodgson, S., Hardy, L. L., Garceau, V., Sweet, M. J., Ross, I. L., Hume, D. A. und Stacey, K. J. (2009). „HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA.“ eng. In: *Science* 323.5917, S. 1057–1060.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lupp, P., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004). „Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner“. In: *European Journal of Immunology* 34.9, S. 2541–2550.
- Sarafianos, S. G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D. M., Parniak, M. A., Hughes, S. H. und Arnold, E. (2009). „Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition.“ eng. In: *J Mol Biol* 385.3, S. 693–713.
- Sarafidou, T., Stamatis, C., Kalouzoumi, G., Spyrou, V., Fthenakis, G. C., Billinis, C. und Mamuris, Z. (2013). „Toll like receptor 9 (TLR9) polymorphism G520R in sheep is associated with seropositivity for Small Ruminant Lentivirus.“ eng. In: *PLoS One* 8.5, e63901.

- Scheel, B., Braedel, S., Probst, J., Carralot, J.-P., Wagner, H., Schild, H., Jung, G., Rammensee, H.-G. und Pascolo, S. (2004). „Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules.“ eng. In: *Eur J Immunol* 34.2, S. 537–547.
- Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C. A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K. A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J. et al. (2009). „Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus.“ eng. In: *Immunity* 31.1, S. 25–34.
- Schmitt, M. E., Bennett, J. L., Dairaghi, D. J. und Clayton, D. A. (1993). „Secondary structure of RNase MRP RNA as predicted by phylogenetic comparison.“ eng. In: *FASEB J* 7.1, S. 208–213.
- Sepulveda, F. E., Maschalidi, S., Colisson, R., Heslop, L., Ghirelli, C., Sakka, E., Lennon-Duménil, A.-M., Amigorena, S., Cabanie, L. und Manoury, B. (2009). „Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells.“ eng. In: *Immunity* 31.5, S. 737–748.
- Shaw, N. N. und Arya, D. P. (2008). „Recognition of the unique structure of DNA:RNA hybrids.“ eng. In: *Biochimie* 90.7, S. 1026–1039.
- Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., Yang, J., Fu, S. und Zhang, D. (2011). „A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus.“ eng. In: *J Biol Chem* 286.6, S. 4517–4524.
- Shinnick, T. M., Lerner, R. A. und Sutcliffe, J. G. (1981). „Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus.“ eng. In: *Nature* 293.5833, S. 543–548.
- Silverman, R. H., Dong, B., Maitra, R. K., Player, M. R. und Torrence, P. F. (2000). „Selective RNA cleavage by isolated RNase L activated with 2-5A antisense chimeric oligonucleotides.“ eng. In: *Methods Enzymol* 313, S. 522–533.
- Sioud, M. (2005). „Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization.“ eng. In: *J Mol Biol* 348.5, S. 1079–1090.
- Søgaard, O. S., Lohse, N., Harboe, Z. B., Offersen, R., Bukh, A. R., Davis, H. L., Schønheyder, H. C. und Østergaard, L. (2010). „Improving the immunogenicity of pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults with a toll-like receptor 9 agonist adjuvant: a randomized, controlled trial.“ eng. In: *Clin Infect Dis* 51.1, S. 42–50.
- Soriano-Sarabia, N., Vallejo, A., Ramírez-Lorca, R., Rodríguez, M. d. M., Salinas, A., Pulido, I., Sáez, M. E. und Leal, M. (2008). „Influence of the Toll-like

- receptor 9 1635A/G polymorphism on the CD4 count, HIV viral load, and clinical progression.“ eng. In: *J Acquir Immune Defic Syndr* 49.2, S. 128–135.
- Soutschek, J., Akinc, A., Bramlage, B., Charisse, K., Constien, R., Donoghue, M., Elbashir, S., Geick, A., Hadwiger, P., Harborth, J., John, M., Kesavan, V., Lavigne, G., Pandey, R. K., Racie, T., Rajeev, K. G., Röhl, I., Toudjarska, I., Wang, G., Wuschko, S. et al. (2004). „Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs.“ eng. In: *Nature* 432.7014, S. 173–178.
- Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T. und Medzhitov, R. (2008). „Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity.“ eng. In: *Cell* 134.4, S. 587–598.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. und Chen, Z. J. (2013). „Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway.“ eng. In: *Science* 339.6121, S. 786–791.
- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A. und Beutler, B. (2004). „Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.“ eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101.10, S. 3516–3521.
- Tabeta, K., Hoebe, K., Janssen, E. M., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Mudd, S., Mann, N., Sovath, S., Goode, J., Shamel, L., Herskovits, A. A., Portnoy, D. A., Cooke, M., Tarantino, L. M., Wiltshire, T., Steinberg, B. E., Grinstein, S. und Beutler, B. (2006). „The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9.“ eng. In: *Nat Immunol* 7.2, S. 156–164.
- Tai, C.-K. und Kasahara, N. (2008). „Replication-competent retrovirus vectors for cancer gene therapy.“ eng. In: *Front Biosci* 13, S. 3083–3095.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyaishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y. und Taniguchi, T. (2007). „DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response.“ eng. In: *Nature* 448.7152, S. 501–505.
- Takeuchi, O. und Akira, S. (2010). „Pattern recognition receptors and inflammation.“ eng. In: *Cell* 140.6, S. 805–820.
- Trinchieri, G. und Sher, A. (2007). „Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence.“ eng. In: *Nat Rev Immunol* 7.3, S. 179–190.
- Unterholzner, L., Keating, S. E., Baran, M., Horan, K. A., Jensen, S. B., Sharma, S., Sirois, C. M., Jin, T., Latz, E., Xiao, T. S., Fitzgerald, K. A., Paludan, S. R.

- und Bowie, A. G. (2010). „IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA.“ eng. In: *Nat Immunol* 11.11, S. 997–1004.
- Varmus, H. (1988). „Retroviruses.“ eng. In: *Science* 240.4858, S. 1427–1435.
- Wasungu, L. und Hoekstra, D. (2006). „Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes.“ eng. In: *J Control Release* 116.2, S. 255–264.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C. und Chen, Z. J. (2013). „Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA.“ eng. In: *Science* 339.6121, S. 826–830.
- Xu, B. und Clayton, D. A. (1996). „RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers.“ eng. In: *EMBO J* 15.12, S. 3135–3143.
- Xu, Y., Hu, Y., Shi, B., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, Q., Sun, S. und Yuan, Z. (2009). „HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN- $\alpha$  production in plasmacytoid dendritic cells.“ eng. In: *Mol Immunol* 46.13, S. 2640–2646.
- Yarovinsky, F. (2014). „Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection.“ eng. In: *Nat Rev Immunol* 14.2, S. 109–121.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. und Sher, A. (2005). „TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein.“ eng. In: *Science* 308.5728, S. 1626–1629.
- Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H. und Wagner, H. (2005). „Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways.“ eng. In: *J Immunol* 174.10, S. 6129–6136.
- Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M. und Kuroda, Y. (2001). „Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus.“ eng. In: *Nat Genet* 28.4, S. 313–314.
- Yu, P., Lübben, W., Slomka, H., Gebler, J., Konert, M., Cai, C., Neubrandt, L., da Costa, O. P., Paul, S., Dehnert, S., Döhne, K., Thanisch, M., Storsberg, S., Wiegand, L., Kaufmann, A., Nain, M., Quintanilla-Martinez, L., Bettio, S., Schnierle, B., Kolesnikova, L. et al. (2012). „Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors.“ eng. In: *Immunity* 37.5, S. 867–879.

- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. und Ghosh, S. (2004). „A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.“ eng. In: *Science* 303.5663, S. 1522–1526.
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K. und Hauser, C. J. (2010). „Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury.“ eng. In: *Nature* 464.7285, S. 104–107.
- Zhu, Q., Egelston, C., Gagnon, S., Sui, Y., Belyakov, I. M., Klinman, D. M. und Berzofsky, J. A. (2010). „Using 3 TLR ligands as a combination adjuvant induces qualitative changes in T cell responses needed for antiviral protection in mice.“ eng. In: *J Clin Invest* 120.2, S. 607–616.

---

## AKADEMISCHE LEHRER

---

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Bauer S., Bauer U., Becker, Bette, Brehm, Daut, Del Rey, Eickmann, Eilers, Elsässer, Feuser, Firtz, Garten, Garn, Glorius, Grzeschik, Hasilik, Hassel, Hertl, Huber, Jacob, Jungclas, Kaufmann, Lill, Löffler, Lohoff, Lüers, Koolmann, Maisner, Matrosovich, Moll, Müller, Müller-Brüsselbach, Oeffner, Petz, Portenier, Renz, Röhm, Schäfer H., Schäfer M., Schmidt, Schulz, Schütz, Suske, Weihe, Westermann



---

## DANKSAGUNG

---

Zunächst danke ich Herrn Prof. Bauer für die Möglichkeit, meine Dissertation, welche sich mit zwei äußerst interessanten Themenbereichen befasst, im Institut für Immunologie zu absolvieren. Vielen Dank für die wissenschaftliche Begleitung, die durch Diskussionen zu theoretischen und praktischen Fragestellungen unterstützt wurde.

Besonderer Dank gilt Dr. Andreas Kaufmann. Du hast mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden und für eine tolle Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe gesorgt, zu der auch Steffi, Vicky, Stephi, Jenny und Charlotte beigetragen haben. Danke für tolle Unterhaltungen und eure Hilfsbereitschaft.

Bei Henriette, Sonja und Lisa bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Mausorganisation, bei Gundi für die Bestellungen sämtlichen Laborbedarfs und bei Marion für die Erledigung des Papierkrams.

Weiterer Dank gilt Steffi. Während des Studiums, der Vorbereitung auf die Diplomprüfung und während der Promotion haben wir so einiges erlebt, viel gelacht und uns gegenseitig unterstützt. Wir haben tolle Mittagspausen verbracht, die vor allem von Torben und Olaf bereichert wurden.

Nicht zuletzt danke ich im ganz Besonderen Dennis, der mir zur Seite steht und immer für mich da ist. Ich bin froh, ein so wunderbares Zuhause zu haben, das mich täglich stärkt. Außerdem danke ich meiner Schwester und meinen Eltern, die immer hinter mir stehen und vieles ermöglichen.